

# **Das neu identifizierte Gen MACC1 ist ein Regulator des HGF/Met-Signalweges und ist prognostisch für die Metastasierung des Kolonkarzinoms**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Franziska Arlt  
(geb. am 13. 6. 1977, Stralsund)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:    1. Prof. Dr. Achim Leutz  
                             2. PD Dr. Ulrike Stein  
                             3. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 10. 2008

Diese Arbeit wurde angefertigt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch unter der Anleitung von PD Dr. Ulrike Stein in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Peter M. Schlag (Chirurgie/Chirurgische Onkologie).

**"Wissen und Erkennen sind die Freude und die Berechtigung  
der Menschheit."**

**Alexander von Humboldt**

*Kosmos, Stuttgart 1845, Band 1, S. 36*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1        EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1        Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>8</b>
1.1.1        Das kolorektale Karzinom: Inzidenzen und Prognosen.....	8
1.1.2        Das hereditäre Kolonkarzinom .....	8
<b>1.2        Entstehung und Progression des Kolonkarzinoms .....</b>	<b>9</b>
1.2.1        Histologie des Dickdarms.....	9
1.2.2        Die maligne Transformation von Zellen des Darmepithels .....	11
1.2.3        Die progressive Tumorigenese des Kolonkarzinoms .....	11
1.2.4        Die Adenom-Karzinom-Sequenz: Molekulare Mechanismen der Tumorprogression .....	12
1.2.5        Der maligne Phänotyp wird durch komplexe genetische Alterationen verursacht .....	13
<b>1.3        Metastasierung des Kolonkarzinoms .....</b>	<b>14</b>
1.3.1        Die Metastasierung ist ein schrittweiser, gerichteter Prozess .....	14
1.3.2        Molekulare Grundlagen der Metastasierung .....	15
<b>1.4        Die Prognose der Metastasierung .....</b>	<b>17</b>
1.4.1        Das System der TNM-Klassifikation.....	17
1.4.2        Molekulare Marker für die Metastasierungsprognose .....	18
<b>1.5        Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) und sein Rezeptor Met.....</b>	<b>20</b>
1.5.1        Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) .....	20
1.5.2        HGF ist der Ligand der Rezeptor-Tyrosinkinase Met .....	20
1.5.3        Der HGF/Met-Signalweg .....	21
1.5.4        Der HGF/Met-Signalweg induziert das invasive Wachstum .....	22
1.5.5        HGF/Met-Expression im Kolonkarzinom .....	23
<b>1.6        MACC1: Identifizierung eines neuen Metastasierungs assoziierten Genes .....</b>	<b>23</b>
1.6.1        MACC1 ist differentiell exprimiert in distanten Metastasen des Kolonkarzinoms.....	23
1.6.2        Genomische Organisation des Gens MACC1 .....	24
1.6.3        Putative Domänenstruktur des Proteins .....	24
<b>1.7        Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>26</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	27
<b>2.1</b>	<b>Expressionsvektoren, Oligonukleotide, Antikörper</b>	27
2.1.1	Eukaryotische Expressionsvektoren	27
2.1.2	Oligonukleotidsequenzen	28
2.1.3	Antikörper	30
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Standardmethoden</b>	31
2.2.1	Klonierungen, Plasmidpräparationen	31
2.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese	31
2.3	MACC1 Expressionsvektoren	32
2.3.1	Klonierung der MACC1 cDNA	32
2.3.2	Generierung der MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP <sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP <sup>mut</sup> Domänen-Varianten	32
<b>2.4</b>	<b>Zellkulturtechniken</b>	33
2.4.1	Zelllinien	33
2.4.2	Transfektion humaner Zelllinien, Etablierung stabiler MACC1 Klone	34
2.4.3	RNA-Interferenz: siRNA Design und Transfektion	34
<b>2.5</b>	<b>RNA- und Protein-Expressionsanalysen</b>	34
2.5.1	RNA-Präparation aus kultivierten Zellen und Patientengewebe	34
2.5.2	Quantitative real-time RT-PCR/qRT-PCR (Two-Step)	35
2.5.3	Immunoblotting	35
<b>2.6</b>	<b>Funktionelle <i>in vitro</i> Assays</b>	37
2.6.1	Migrationsassay	37
2.6.2	Invasionsassay	37
2.6.3	Scatterassay	37
2.6.4	Wundheilungsassay (gerichtete Migration)	38
2.6.5	Koloniebildung im Softagar	38
2.6.6	Proliferationsassay	38
<b>2.7</b>	<b>Analyse der subzellulären Lokalisation</b>	38
2.7.1	Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.7.2	Präparation der Kernextrakte und cytoplasmatischer Fraktionen	39
<b>2.8</b>	<b>Promotoranalysen</b>	39
2.8.1	CAT-Reportergenstudien	39
2.8.2	Chromatin-Immunpräzipitation	40
<b>2.9</b>	<b><i>In vivo</i> Metastasierung</b>	42
2.9.1	Tiermodelle	42
2.9.2	Molekularer Nachweis humaner Zellen in murinen Lebergeweben	42
<b>2.10</b>	<b>Analyse klinischer Tumorproben</b>	42
2.10.1	Patientengewebe	42
2.10.2	Aufarbeitung der Gewebeproben	43
2.10.3	Statistische Auswertung der Patientendaten	43

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>MACC1-Expression in Tumorzellen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>MACC1 induziert Migration, Invasion und Proliferation in Tumorzellen .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	MACC1 reguliert das migratorische Verhalten von Tumorzellen.....	47
3.2.2	MACC1 induziert das invasive Wachstum .....	49
3.2.3	MACC1 aktiviert die adhäsions-unabhängige Proliferation .....	50
<b>3.3</b>	<b>MACC1 reguliert Migration, Invasion und Proliferation in der endogen MACC1-exprimierenden Zelllinie SW620.....</b>	<b>51</b>
<b>3.4</b>	<b>MACC1 aktiviert den HGF/Met-Signalweg in Tumorzellen.....</b>	<b>54</b>
3.4.1	HGF induziert die epitheliale-mesenchymale Transition in Abhängigkeit der MACC1-Expression .....	54
3.4.2	MACC1 vermittelt die HGF-abhängige Proliferation.....	56
3.4.3	HGF-Induktion führt zur Translokation von MACC1 in den Zellkern..	57
<b>3.5</b>	<b>MACC1 interagiert mit dem Promotor des HGF-Rezeptors Met..</b>	<b>60</b>
3.5.1	MACC1 reguliert die Promotor-Aktivität des HGF-Rezeptors Met.....	60
3.5.2	MACC1 bindet an den endogenen Met-Promotor .....	62
<b>3.6</b>	<b>MACC1 reguliert die Expression des HGF-Rezeptors Met in Tumorzellen .....</b>	<b>63</b>
3.6.1	Met ist ein direktes, transkriptionelles Zielgen von MACC1 .....	63
3.6.2	Die MACC1-induzierten biologischen Effekte werden durch HGF/Met vermittelt.....	64
<b>3.7</b>	<b>Der HGF/Met-Signalweg vermittelt Motilität und Proliferation in der endogen MACC1-exprimierenden Zelllinie SW620 .....</b>	<b>66</b>
<b>3.8</b>	<b>MACC1 induziert die Metastasierung im <i>in vivo</i> Modell .....</b>	<b>68</b>
3.8.1	Metastasierung stabiler SW480/MACC1-Transfektanten .....	68
3.8.2	Metastasierung stabiler LS 174T/MACC1-Transfektanten .....	69
<b>3.9</b>	<b>MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms .....</b>	<b>70</b>
3.9.1	MACC1-Expression in der Tumorprogression.....	71
3.9.2	MACC1 ist ein neu identifizierter, unabhängiger, prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms .....	72
3.9.3	MACC1 ist ein besserer Prognosefaktor als Met.....	75

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>MACC1 ist ein neu identifiziertes Protein mit Funktion in derSignaltransduktion .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>MACC1 determiniert das metastatische Potential von Tumorzellen .....</b>	<b>79</b>
4.2.1	MACC1 induziert Motilität, Invasivität und Proliferation .....	79
4.2.2	MACC1 und die <i>in vivo</i> Metastasierung .....	80
<b>4.3</b>	<b>MACC1 und der HGF/Met-Signalweg .....</b>	<b>81</b>
4.3.1	MACC1 aktiviert den HGF/Met-Signalweg .....	81
4.3.2	MACC1 interagiert mit HGF/Met-induzierten MAPK-Signalen.....	82
4.3.3	MACC1 reguliert die Expression des HGF-Rezeptors Met.....	84
<b>4.4</b>	<b>MACC1 als neues Zielgen für die Prävention der Metastasierung .....</b>	<b>88</b>
<b>4.5</b>	<b>MACC1 und die Metastasierungsprognose bei Kolonkarzinom-Patienten .....</b>	<b>90</b>
4.5.1	MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung .....	90
4.5.2	Die Prognose durch MACC1 und Met .....	92
<b>4.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>93</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>109</b>
	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>113</b>
	<b>PUBLIKATIONEN UND TEILNAHME AN KONGRESSEN.....</b>	<b>114</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>116</b>

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ACF	Abberant crypt foci
ANOVA	Analysis of variance
APC	Adenomatous polyposis coli
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BMPR1A	Bone morphogenic protein receptor 1A
CAM	Cell adhesion molecule
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD44	Cluster of differentiation 44
cDNA	copy-DNA (auch complementary DNA)
CEA	Carcinoembryonic antigen
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIN	Chromosomen-Instabilität
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid Hydrat
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTM	European Group on Tumour Markers
EH	Eps15 homology domain
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ENG	Endoglin
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
EST	Expressed sequence tag
FAK	Focal adhesion kinase
FAP	Familial adenomatous polyposis
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
Gab1	Growth-factor receptor-bound protein 2 (Grb2) associated binder 1
Grb2	Growth-factor receptor-bound protein 2
HGF	Hepatocyte-growth-factor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
HPLC	High performance liquid chromatography
HUGO	Human Genome Organisation
IGF	Insulin-like Growth Factor
JNK	Jun amino-terminal kinase



LOH	Loss of heterozygosity
MACC1	Metastasis-associated in colon cancer 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEK1/2	MAPK/ERK kinases 1/2
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrix metalloproteinase
MSI	Microsatellite instability
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear factor-κB
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
Pak	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase
Pax	Paxillin
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen,
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate,
PLCγ	Phospholipase C γ
PRL-3	Phosphatase of regenerating liver 3
PTB	Phosphotyrosine binding domain
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome Ten
RACE	rapid amplification of cDNA ends
ROC	Receiver Operating Characteristic
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Media 1640
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Scatter factor
SH2/3	Src homology 2/3 domain
SH3BP4	SH3-binding protein 4
Shc	Src-homology-2 (SH2)-domain-containing
Shp2	SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2
siRNA	small interfering RNA
sLe <sup>x</sup>	Sialyl Lewis <sup>x</sup> antigen
Smad4	Mothers against decapentaplegic homologue 4
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
STK11	Serine/threonine kinase 11
TfR	Transferrin receptor
TGF-βRII	Transforming growth factor β receptor II
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TNM	Tumor/Node/Metastasis (Tumor-Klassifikationssystem)
Tpr-Met	Translocated promoter region fused to Met
TTP	Transferrin receptor trafficking protein
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Kolonkarzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Etwa 50 % der Patienten entwickeln Fernmetastasen. Diese haben eine sehr schlechte Überlebensprognose. Deshalb fokussiert die Forschung auf die Identifizierung neuer, molekularer Marker für eine verbesserte Metastasierungsvorhersage. Identifizierte Hochrisiko-Patienten könnten somit rechtzeitig eine individualisierte, intensivere Therapie erhalten.

MACC1 (Metastasis-associated in colon cancer 1) ist ein neu identifiziertes Gen, das in Kolonkarzinomen und deren Fernmetastasen überexprimiert wird. Die Domänenstruktur von MACC1 ist kennzeichnend für Proteine der Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwege. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der zellulären Funktion von MACC1 und seiner Rolle in der Tumorprogression sowie die Evaluierung von MACC1 als molekularer Metastasierungsmarker.

MACC1-überexprimierende Tumorzellen zeigten in Abhängigkeit von der Domänenstruktur in *in vitro* Assays ein erhöhtes migratorisches, invasives und proliferatives Potential. Der Einfluss von MACC1 auf die Metastisierungskapazität von Tumorzellen konnte auch im Tiermodell belegt werden. Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) induziert die epitheliale-mesenchymale Transition MACC1-exprimierender Zellen und die nukleäre Translokation von MACC1. Die Expression des HGF-Rezeptors Met war in diesen Zellen stark erhöht. Reporter-gen-Studien bestätigten die transkriptionelle Regulation von Met durch MACC1. Die Analyse humaner Kolonkarzinome ergab eine signifikant höhere MACC1 Expression in Primärtumoren mit metachroner Fernmetastasierung.

MACC1 ist ein neu identifizierter Regulator des HGF/Met-Signalweges und trägt somit entscheidend zur Determinierung des metastatischen Potentials von Tumorzellen bei. MACC1 hat großes Potential als neuer, prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms und ist ein Kandidatengen als Ziel effektiver, molekularer Interventionsstrategien zur Metastasierungs-Prävention.

Schlagworte: Kolonkarzinom, Metastasierung, MACC1, HGF/Met

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

### 1.1.1 Das kolorektale Karzinom: Inzidenzen und Prognosen

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Tumorerkrankung in entwickelten Ländern. Allein in Deutschland wird jährlich bei mehr als 70 000 Menschen eine Neuerkrankung diagnostiziert.<sup>1</sup> Das Lebenszeitrisko einer Erkrankung liegt derzeit bei 5 %.

Frauen erkranken im Mittel mit 75 Jahren, Männer mit 69 Jahren; im Durchschnitt also recht spät.<sup>1</sup> Dies spiegelt sich auch in den stark unterschiedlichen Inzidenzen (Zahl der Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner) der verschiedenen Altersgruppen wider. Bei den unter 45 Jährigen beträgt die Inzidenz nur 4,3. In der Altersgruppe ab 50 Jahren ist jedoch eine starke Zunahme der Neuerkrankungen zu verzeichnen, mit einer Verdopplung des Risikos mit jeder Lebensdekade. Bei den 60 bis 75 Jährigen liegt die Rate der Neuerkrankungen bereits bei 300 je 100 000 Einwohner.<sup>1</sup> In Deutschland stagniert die Inzidenz seit Mitte der 1990er Jahre auf relativ hohem Niveau, die Mortalität zeigt einen leicht rückläufigen Trend.

Trotz Ausweitung der Vorsorgeprogramme wird die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome im bereits fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. So zeigen 57% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits regionale oder distante Metastasierung.<sup>2,3</sup> Mehrere Studien wiesen nach, dass die Prognose des Patienten durch das Entwicklungsstadium des Tumors und entscheidend durch den Metastasierungsstatus determiniert wird.<sup>4,5</sup> Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate aller Patienten liegt in Deutschland bei 60%.<sup>1</sup> Patienten mit Karzinomen im frühen Stadium zeigen sehr gute 5-Jahres-Überlebensraten von 93%. Liegt bereits ein Befall der regionalen Lymphknoten vor, so verschlechtert sich die Überlebensrate auf 60%. Ist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Metastasierung in entfernte Organe nachweisbar, so verringert sich die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit drastisch auf nur 8%.

Über 90% der Kolonkarzinom-bedingten Todesfälle haben ihre Ursache in der distanten Metastasierung des Primärtumors.<sup>6</sup> Somit stellt die Fernmetastasierung den entscheidenden Faktor für die Überlebensprognose des Patienten dar.

### 1.1.2 Das hereditäre Kolonkarzinom

Schätzungen gehen davon aus, dass 20-25% der Kolonkarzinomerkrankungen einen familiären Hintergrund haben.<sup>7,8</sup> Dabei ist es häufig problematisch zu differenzieren, ob tatsächlich eine familiäre Prädisposition besteht, oder ob es sich um eine zufällige Häufung sporadischer Tumorerkrankungen handelt. Für etwa 10% aller Fälle wird heute ein direkter hereditärer Zusammenhang mit autosomal dominanter Vererbung entsprechend der Mendel'schen Gesetze angenommen.<sup>9</sup> Die am besten untersuchten hereditären Kolonkarzinom-Erkrankungen sind FAP (Familiäl adenomatous polyposis) und das Lynch-

Syndrom [auch HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer)]. Sie sind gemeinsam verantwortlich für 5% aller auftretenden Kolonkarzinome.<sup>10</sup>

FAP wird charakterisiert durch das bereits in der Adoleszenz beginnende Auftreten von bis zu tausenden Polypen im Darm. Einige dieser Polypen entwickeln sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% zu Adenokarzinomen.<sup>7</sup> Die molekulare Ursache für FAP liegt in der Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgenes APC (Adenomatous polyposis coli), dem „Gatekeeper“ des Wnt-Signaltransduktionsweges.<sup>8</sup> Dem Lynch-Syndrom liegen Mutationen in verschiedenen Genen des Mismatch-Reparatursystems und der daraus resultierenden Mikrosatelliten-Instabilität zugrunde. In 90% der Fälle sind die Gene MLH1, MSH2 oder MSH6 (bakterielle MutL/MutS Homologe) mutiert.<sup>9</sup> Betroffene Patienten entwickeln mit 80%iger Wahrscheinlichkeit bereits im frühen Alter (~45 Jahre) Kolonkarzinome.<sup>7</sup>

FAP und Lynch-Syndrom sind jedoch nur für einen Teil der heute als hereditär assoziierten Kolonkarzinom-Fälle verantwortlich. Daneben wurde eine Reihe weiterer erblicher Mutationen identifiziert, die zu einer Prädisposition für das Kolonkarzinom führen, aber alle eine sehr geringe Inzidenz zeigen. So z.B. das Peutz-Jeghers-Syndrom [Mutation in STK11 (Serine/threonine kinase 11)], die Familiäre Juvenile Polyposis [Mutationen in BMPR1A (Bone morphogenic protein receptor 1A), Smad4 (Mothers against decapentaplegic homologue 4) und ENG (Endoglin)] oder das Cowden's Syndrom [PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome Ten) Mutation].<sup>8,9</sup>

Der bei weitem überwiegende Teil der diagnostizierten Kolonkarzinome ist nicht hereditären Ursprungs, sondern hat seine Ursache in der Akkumulation mehrerer sporadischer Mutationen in somatischen Zellen des Kolons. Die Analysen der molekularen Ursachen hereditärer Tumorerkrankungen bildeten jedoch die Grundlage für das heutige Wissen über die spontane maligne Transformation epithelialer Darmzellen.<sup>10</sup>

## 1.2 Entstehung und Progression des Kolonkarzinoms

### 1.2.1 Histologie des Dickdarms

Kolon (Dickdarm) und Rektum (Mastdarm) bilden den distalen Teil des humanen Gastrointestinaltraktes. Der etwa 1,5 m lange Dickdarm wird in mehrere Abschnitte unterteilt, proximal beginnend mit dem *Caecum*, gefolgt von *Colon ascendens*, *transversum* und *descendens* und distal endend mit dem *Colon sigmoideum* und dem *Rectum* (Abb. 1.1 A). Die Hauptfunktion des Kolons liegt in der Resorption von Wasser und Elektrolyten aus dem Speisebrei, sowie in der Speicherung des Darminhaltes bis zur Entleerung. Im Gegensatz zum Dünndarm verfügt das Kolon zur Oberflächenvergrößerung ausschließlich über Krypten, nicht über Zotten.

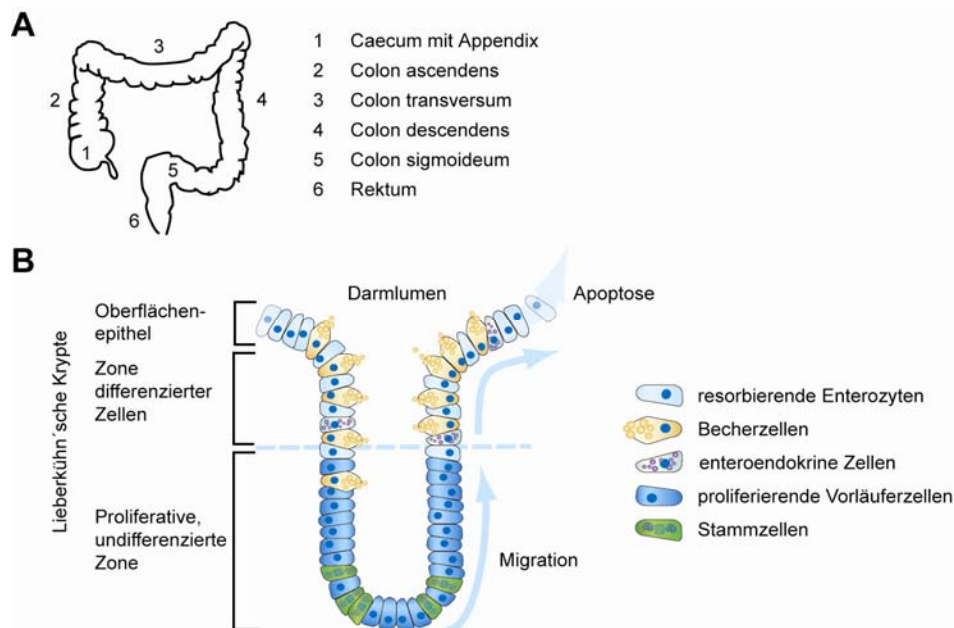
Die Darmwand zeigt einen vierschichtigen Aufbau: Die dem Darmlumen zugewandte, Schleim sezernierende *Tunica mucosa* gewährleistet das Gleiten des Nahrungsbreies. In der angrenzenden Bindegewebsschicht, der *Tela submucosa*, liegen Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenzellen. Die darunter liegende Muskelschicht, *Tunica muscularis*, erlaubt die Peristaltik des Darmrohres. Die *Tunica serosa* bildet die Abgrenzung zur Bauchhöhle.

Die Kolonmucosa ist ein sich permanent selbst-regenerierendes Gewebe. Das einschichtige, hochprismatische Epithel bildet 0,5 mm tiefe Einstülpungen, die Lieberkühn'schen Krypten. Innerhalb dieser Krypten können ein proliferativer, undifferenzierter Bereich am Kryptenboden und eine ausdifferenzierte, luminale Zone definiert werden (Abb. 1.1 B).<sup>11</sup> Die im Bereich des Fundus liegenden 4-6 Stammzellen bilden durch asymmetrische Teilung die schnell proliferierenden, Vorläuferzellen, die entlang der Krypte Richtung Darmlumen migrieren.<sup>12,13</sup>

Diese Vorläuferzellen haben nur eine limitierte Zellteilungskapazität. Nach 3-4 Mitosen stellen sie die Proliferation ein und differenzieren in einen der drei maturen Zelltypen der Kolonmucosa im luminalen Kryptenbereich: die Schleim sekretierenden Becherzellen, Enterozyten (resorbierende Saumzellen mit Mikrovilli) und Hormon-sekretierende enteroendokrine Zellen.

In einem Zeitraum von 5 Tagen migrieren die Zellen vom Kryptenboden bis in das Oberflächenepithel, wo sie in Apoptose gehen und abgestoßen werden.

So werden innerhalb kurzer Zeit die epithelialen Zellen in der Krypte vollständig ersetzt. In diesem hochproliferativen Gewebe ist eine strikte Regulation der Homöostase zwischen Zellneubildung und Apoptose essentiell. Eine Deregulation dieses Gleichgewichts kann zur Bildung von Neoplasien führen und ist assoziiert mit frühen Progressionsstadien des Kolonkarzinoms.<sup>14,15</sup>



**Abb. 1.1: Allgemeiner Aufbau des Dickdarms.**

(A) Innerhalb des Dickdarms werden verschiedene Abschnitte unterschieden: Das proximale Caecum (Blinddarm) mit dem Appendix, gefolgt vom aufsteigenden, quer verlaufenden, absteigenden und S-förmigen Kolon. Den distalen Abschluss bildet das Rektum. (B) Die Lieberkühn'schen Krypten der Darmmucosa sind hochproliferative Strukturen, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Sie zeigen eine Zone proliferativer, undifferenzierter Zellen am Kryptenboden und eine Zone differenzierter, teilungsunfähiger Zellen im luminalen Bereich. Die von den Stammzellen am Kryptenboden gebildeten Vorläuferzellen migrieren entlang der Krypte in Richtung der luminalen Zone und differenzieren dort in einen der 3 Zelltypen der Kolonmucosa: resorbierende Enterozyten, schleimbildende Becherzellen oder Hormone sekretierende enteroendokrine Zellen. Modifiziert nach Weinberg, Radtke et al.<sup>11,14</sup>

### 1.2.2 Die maligne Transformation von Zellen des Darmepithels

In hochproliferativen Geweben wie der Darmmucosa ist die Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose essentiell. Wird das Gleichgewicht zu Gunsten der Proliferation gestört kommt es zur Bildung von Dysplasien, Akkumulationen proliferierender Zellen mit mangelnder Differenzierung.<sup>11,16</sup> Für die Entstehung dieser frühen, benignen Vorstufen des Karzinoms wurden 2 Modelle vorgeschlagen: Das Modell der „Top-down“ Morphogenese geht von transformierten Zellen des Oberflächenepithels aus, die sich lateral und abwärts ausbreiten und das normale Epithel anliegender Krypten ersetzen.<sup>17</sup> Im Gegensatz dazu beschreibt das zweite Modell eine klonale Expansion im Bereich des Kryptenfundus transformierter Zellen aufwärts entlang der Krypte („Bottom-up“ Morphogenese) und ein initiales Wachstum durch erhöhte Kryptenteilung.<sup>18</sup>

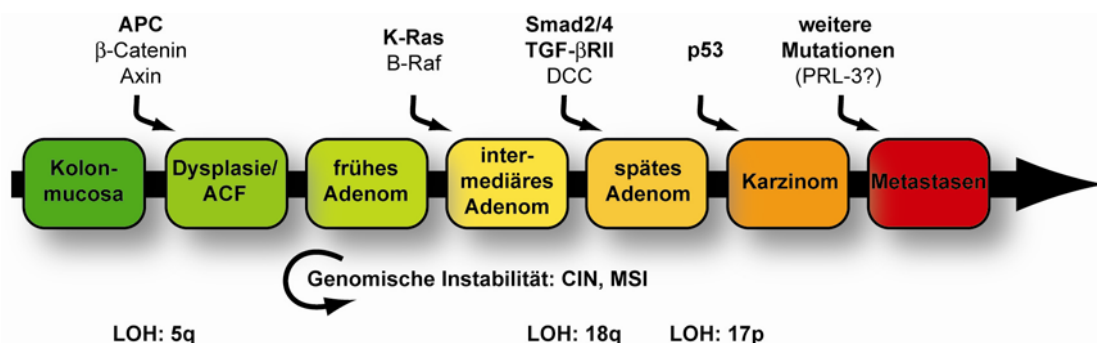
Es ist nicht vollständig geklärt, welcher epitheliale Zelltyp das Ziel der initialen transformierenden Mutationen der Karzinogenese darstellt. Immer mehr Studien weisen jedoch darauf hin, dass diese frühen Mutationen nicht in den differenzierten Zellen, die die proliferative Fähigkeit bereits eingebüßt haben, sondern in den zur Teilung befähigten Stammzellen und Vorläuferzellen der Krypten stattfinden.<sup>11,18-21</sup> Bisher sind relativ wenige Zielgene dieser frühen Mutationen identifiziert. Die Ergebnisse stammen vorrangig aus intensiven Untersuchungen hereditärer Tumorerkrankungen und deren molekularen Ursachen.<sup>14,16,22</sup> Interessanterweise haben die mit frühen Stadien der malignen Transformation assoziierten Signaltransduktionswege ebenfalls Funktion in der Regulation der Homöostase im Kolonepithel und der Aufrechterhaltung des Stammzellkompartimentes, aber auch in der Embryonalentwicklung. Hierzu gehören z.B. die Wnt-, TGF- $\beta$ /BMP-, Notch- und Hedgehog-Signalwege.<sup>15,22-24</sup>

### 1.2.3 Die progressive Tumorigenese des Kolonkarzinoms

Die maligne Transformation normaler epithelialer Darmzellen zum invasiven, metastasierenden Kolonkarzinom zeigt einen schrittweisen Verlauf.<sup>11</sup> Diese aufeinander folgenden Progressionsstadien sind histopathologisch heute sehr gut charakterisiert.<sup>11</sup> Die ersten detektierbaren Läsionen werden als aberrante Krypten Foci (ACF) bezeichnet. Es handelt sich um kleine dysplastische Läsionen des Kolonepithels, die durch die Akkumulation proliferativer, relativ undifferenzierter Zellen in den Krypten gekennzeichnet sind. Durch Expansion der ACFs bilden sich makroskopisch sichtbare, benigne, adenomatöse Polypen (Adenome). Diese entwickeln sich weiter zum *Carcinoma in situ*. Dieses frühe Stadium des Karzinoms zeigt noch keine Invasion durch die Basallamina ins angrenzende Stroma, ist jedoch eine Vorstufe des malignen, regional invasiven Karzinoms. Das am weitesten fortgeschrittene Progressionsstadium des Kolonkarzinoms zeigt neben einer Infiltration des umliegenden Gewebes auch Metastasierung in distante Organe wie Leber und Lunge.<sup>11</sup>

### 1.2.4 Die Adenom-Karzinom-Sequenz: Molekulare Mechanismen der Tumorprogression

Molekularbiologische Analysen der histopathologisch identifizierten Tumorprogressionsstadien führten zur Definition der Adenom-Karzinom-Sequenz (Abb. 1.2).<sup>25,26</sup> Diesem Modell entsprechend liegen der Entstehung und Progression des Kolonkarzinoms die sequenzielle Akkumulation von inaktivierenden Mutationen in Tumorsuppressorgenen und aktivierenden Mutationen in Proto-Onkogenen, sowie epigenetische Alterationen zugrunde. Vier bis sieben unabhängige, transformierende Ereignisse gelten dabei als notwendig für eine Progression normaler Epithelzellen zum metastasierenden Karzinom. Dieser schrittweise Prozess kann sich über mehrere Dekaden hinweg vollziehen, ein Indiz hierfür ist das stark ansteigende Erkrankungsrisiko im höheren Lebensalter.<sup>26,27</sup> Einige Mutationen scheinen in einer bevorzugten Reihenfolge in der Adenom-Karzinom-Sequenz aufzutreten. Es ist jedoch bisher nicht geklärt, ob die Tumoreigenschaften allein durch die Akkumulation der Ereignisse determiniert werden, oder ob die Chronologie der Mutationen eine entscheidende Rolle spielt.<sup>25,28</sup> Seit der Formulierung des Modells im Jahr 1990 wurde die molekulare Funktion der Schlüsselmoleküle in der Adenom-Karzinom-Sequenz detailliert untersucht.



**Abb. 1.2: Die Adenom-Karzinom-Sequenz als Modell der Tumorigenese.**

Tumorinitiation und -progression bis zum Stadium des malignen Karzinoms werden verursacht durch die schrittweise Akkumulation aktivierender Mutationen in Onkogenen, inaktivierender Mutationen in Tumorsuppressorgenen und epigenetischer Alterationen. (CIN: Chromosomal instability, DCC: Deleted in colorectal carcinoma, LOH: Loss of heterozygosity, MSI: Microsatellite instability, PRL-3: Phosphatase of regenerating liver 3, TGF-βRII: Transforming growth factor β receptor II). Modifiziert nach Fearon et al, Pinto et al., Sancho et al.<sup>22,24,25</sup>

Zu den initialen Alterationen gehören Mutationen in Komponenten des Wnt/β-Catenin-Signalweges. In 85% der frühen Progressionsstadien sind Mutationen des Tumorsuppressors APC nachweisbar.<sup>11,22</sup> APC ist ein Schlüsselmolekül des β-Catenin Phosphorylierungskomplexes. Unphosphoryliertes β-Catenin entgeht der Degradation, akkumuliert im Zellkern und aktiviert dort Zielgene, die die Proliferation vorantreiben.

Mutationen des Onkogens K-Ras sind in 50-60% der transformierten Gewebe nachweisbar.<sup>29</sup> Die GTPase vermittelt Rezeptor-Tyrosinkinase-Signaltrans-

duktion und steuert die Proliferation.<sup>25,30</sup> Smad2, Smad4 und der TGF- $\beta$ -Rezeptor II sind Komponenten des Wachstums-supprimierenden TGF- $\beta$ -Signalweges. Inaktivierung dieser Moleküle durch Mutation macht Tumorzellen insensitiv gegenüber den antiproliferativen Signalen des Liganden TGF- $\beta$ . Die Transition vom späten Adenom zum Karzinom ist häufig assoziiert mit Mutationen im p53 Tumorsuppressor, dem Schlüsselmolekül der Zellzykluskontrolle und der Apoptose-Regulation.<sup>29</sup>

Neben diesen Genmutationen spielt die Genomische Instabilität der Zellen eine zentrale Rolle in der Karzinogenese. Es wird zwischen Chromosomaler Instabilität (CIN) und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) unterschieden. Die CIN führt zu Allelverlust und Aneuploidie und treibt somit die Tumorprogression voran. So zeigen 75% der Kolonkarzinome Verluste großer Abschnitte der Chromosomenarme 17p und 18q, die für die Tumorsuppressorgene p53 bzw. Smad2/4 und TGF- $\beta$ RII kodieren.<sup>29</sup> Eines der beiden Allele geht somit verloren (Loss of Heterozygosity, LOH). Trägt das verbleibende Allel bereits eine inaktivierende Mutation, führt dies zum vollständigen Funktionsverlust des Tumorsuppressors.<sup>31</sup> Durchschnittlich 25-30% aller Allele sind in Tumorzellen deletiert.<sup>32</sup> Die CIN hat ihre Ursache in der frühen Inaktivierung von APC, dessen C-Terminus eine wichtige Funktion bei Stabilisierung des mitotischen Spindelapparates innehat.<sup>33</sup> Etwa 15% der Kolonkarzinome weisen eine Instabilität der Mikrosatelliten (MSI) auf, die durch Mutationen in Genen des Mismatch-Reparatursystems verursacht wird.<sup>27</sup> Gene, deren kodierende Sequenz diese repetitiven Sequenzen enthält, unterliegen stark erhöhten Mutationsraten, so z.B. TGF- $\beta$ RII.<sup>7</sup>

### **1.2.5 Der maligne Phänotyp wird durch komplexe genetische Alterationen verursacht**

Im Jahr 2000 formulierten D. Hanahan und R. A. Weinberg die charakteristischen Eigenschaften einer Tumorzelle. Hierzu gehören die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen, Umgehung der Apoptose, ein unbegrenztes replikatives Potential, eine anhaltende Angiogenese und die Fähigkeit, in umliegendes Gewebe zu invadieren und zu metastasieren.<sup>34</sup> Als eine Voraussetzung für den Erwerb dieses Phänotyps definierten sie die genetische Instabilität, die durch den Verlust der kontrollierten DNA-Replikation beschleunigte Mutationsraten in der Tumorzelle zulässt.<sup>34,35</sup>

Die Grundlage für ein Verständnis der molekularen Mechanismen, die zu diesem malignen Status führen, wurde bereits mit der Adenom-Karzinom-Sequenz gelegt. Bis heute wurden in mehreren hundert Genen Mutationen mit Implikationen in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. Betroffen sind hauptsächlich Proteine des DNA-Reparatursystems, Proteinkinasen und Transkriptionsregulatoren.<sup>36</sup> Als Komponenten eines immer komplexer werdenden, interagierenden Netzwerks von Signaltransduktionskaskaden regulieren sie die Expression verschiedenster Zielgene.<sup>37,38</sup> Mittels Microarray-Technologie erstellte, Genom-weite Expressionsprofile ergaben für 2% der ausgewerteten Gene eine differentielle Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe.<sup>39</sup> Die identifizierten Gene haben Funktionen in der Zellzyklusregulation und Proliferation, Signaltransduktion, Zelladhäsion und –



kommunikation, Entwicklung, Angiogenese, Apoptose, im zellulären Metabolismus und im DNA-Reparatursystem.<sup>39</sup>

Neben der Mutation regulatorischer Gene führt auch das abberante DNA-Methylierungsmuster transformierter Zellen zur deregulierten Genexpression. Im Kontrast zur generellen Hypomethylierung des Genoms maligner Zellen kommt es zur epigenetischen Stilllegung z.B. von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung des Promotors.<sup>40,41</sup>

Die Mutationen und epigenetischen Alterationen, die die Tumorentstehung und -progression bedingen, sind heute recht gut charakterisiert. Bisher gibt es jedoch nur wenige Daten zu den molekularen Mechanismen, die letztendlich zur Metastasierung des kolorektalen Karzinoms führen.

## 1.3 Metastasierung des Kolonkarzinoms

### 1.3.1 Die Metastasierung ist ein schrittweiser, gerichteter Prozess

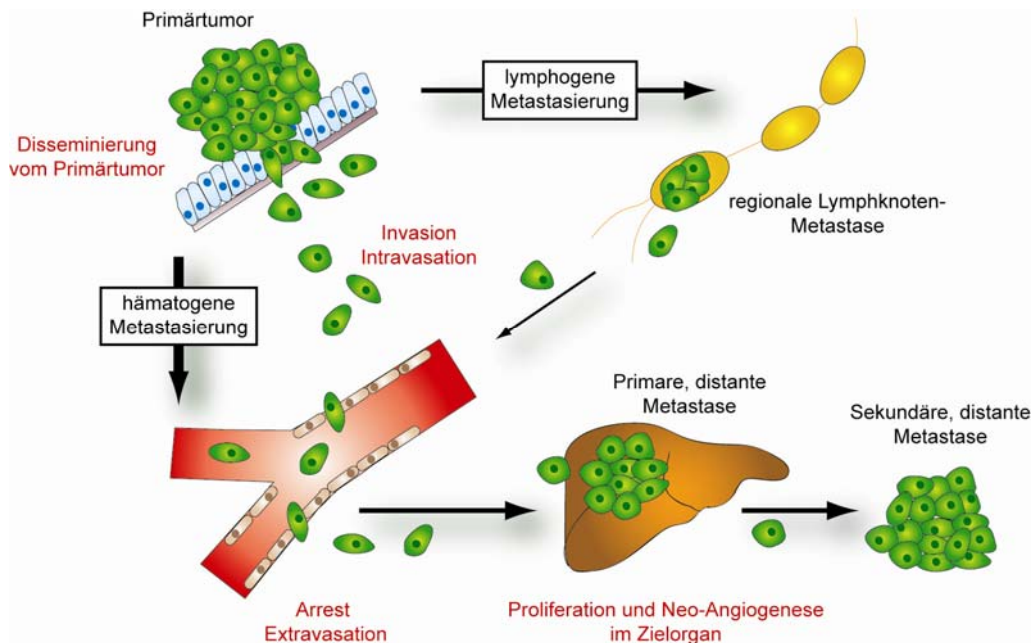
90% aller Tumor-bedingten Todesfälle sind auf die Metastasierung des Primärtumors in entfernte Organe zurückzuführen.

Nach D. Welch gilt für den Metastasierungsprozess folgende Definition: Metastasierung ist die Disseminierung neoplastischer Zellen in distante Organe, wo sie eine extravaskulär proliferierende Masse unvollständig differenzierter Zellen bilden.<sup>42</sup> Der Mechanismus der Metastasierung ist heute gut beschrieben: In einem ersten Schritt disseminieren einzelne Zellen vom Primärtumor und invadieren durch die Basallamina und das umgebende Gewebe bis in nahe gelegene Blutgefäße (Intravasation). Die zirkulierenden Tumorzellen werden über das vaskuläre System transportiert, bis sie in den Kapillaren distanter Organe arretiert werden und durch die Gefäßwand in das angrenzende Gewebe eindringen (Extravasation). Daraufhin erfolgt die Initiation von Wachstum und Neo-Angiogenese.

Es wird zwischen lymphogener und hämatogener Metastasierung unterschieden.<sup>43,44</sup> Im Falle der lymphogenen Metastasierung werden zunächst regionale Metastasen im anliegenden Lymphsystem gebildet. Lymphknotenmetastasen sind ein wichtiger Indikator für das Progressionsstadium des Tumors. Sie tragen aber nur in seltenen Fällen zur Fernmetastasierung bei.<sup>11,45</sup> Die Metastasierung in distante Organe verläuft vorrangig über den hämatogenen Weg: Die disseminierten Tumorzellen invadieren direkt das Blutgefäßsystem und werden im Zielorgan arretiert.<sup>46</sup>

Nach Daten des Tumorzentrums Heidelberg/Mannheim zeigen Kolonkarzinom-Patienten in 75% der Fälle eine Metastasierung in die Leber, zu 15% in die Lunge und zu jeweils 5% in Gehirn und Knochen.<sup>47</sup> Diese Organspezifität der Metastasierung weist darauf hin, dass der Prozess nicht ungerichtet abläuft, sondern selektiven Mechanismen unterliegt. Aufgrund dieser Beobachtung formulierte S. Paget bereits 1889 die Hypothese des „Seed and Soil“. <sup>48,49</sup> Demnach wird die Metastasierung nicht allein durch die Eigenschaften der disseminierten Tumorzellen (Seed) determiniert, sondern ist ebenso abhängig von den Bedingungen, die in der Organ-Mikroumgebung (Soil) herrschen. Im Gegensatz hierzu schlug J. Ewing 1928 einen rein mechanistischen Ablauf vor. In diesem Modell liegt der Metastasierung allein der Arrest der Tumorzellen in den feinen Kapillaren des Gefäßsystems der Organe zugrunde.<sup>49,50</sup> Heute wird

angenommen, dass die Organspezifität der Metastasierung sowohl durch die Anatomie des vaskulären Systems, als auch durch die Kompatibilität der Tumorzelle mit der Mikroumgebung des präferierten Zielorgans bedingt wird.<sup>43,49</sup>



**Abb. 1.3: Distanten Metastasierung des Kolonkarzinoms.**

Vom Primärtumor disseminierte Tumorzellen invadieren über den hämatogenen oder, in seltenen Fällen, den lymphogenen Weg in die Blutgefäße (Intravasation) und gelangen über den Blutkreislauf zu entfernt liegenden Organen. Hier werden sie arretiert und invadieren in anliegende Organe (Extravasation), wo durch erneute Proliferation und Neo-Angiogenese Fernmetastasen gebildet werden.

Modifiziert nach Steeg, Pantel et al., Stein et al.<sup>5,44,51</sup>

### 1.3.2 Molekulare Grundlagen der Metastasierung

Die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, sind Gegenstand der derzeitigen Forschung. Es sind zwei unterschiedliche „molekulare“ Metastasierungsmodelle in der Diskussion: Die Adenom-Karzinom-Sequenz definiert den metastatischen Phänotyp als letzten Schritt einer linearen Akkumulation molekularer Veränderungen.<sup>25</sup> Nach dem heute favorisierten Modell wird die metastatische Kapazität der Zelle dagegen schon in einem frühen Stadium der Tumorprogression determiniert.<sup>52,53</sup> Hierfür sprechen unter anderem Microarray-Analysen, die nachwiesen, dass sich die Expressionsmuster metastasierter Zellen nur wenig von denen des Primärtumors unterscheiden.<sup>54,55</sup>

Die Metastasierung ist ein extrem ineffizienter Prozess mit vielen limitierenden Schritten.<sup>43,56</sup> So wurde im Tiermodell gezeigt, dass nur 0,01% der Zellen eines Primärtumors letztlich Metastasen bilden.<sup>49,57</sup> Dies wird gestützt durch den Nachweis, dass Tumoren aus heterogenen Subpopulationen bestehen, von denen nur wenige Zellen die Kapazität unbegrenzter Proliferation und

Metastasierung aufweisen.<sup>49,58</sup> Metastasen sind meist klonalen Ursprungs, entwickeln jedoch aufgrund der genetischen Instabilität und der hohen Proliferationsraten eine sekundäre Heterogenität.<sup>42,59</sup>

Der metastatische Phänotyp wird durch die folgenden Eigenschaften definiert: Dysregulierte Adhäsion, hohe Invasivität und Motilität, Apoptose-Resistenz, Umgehung der Immunantwort sowie Modulation der Mikroumgebung, Proliferation und Angiogenese im Zielorgan.<sup>42</sup> Die diesem Phänotyp zugrunde liegenden molekularen Prozesse sind bereits teilweise charakterisiert. So wurde nachgewiesen, dass der Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion der Tumorzellen auf einer veränderten Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen wie Integrinen und Cadherinen beruht. Invasivität und Motilität haben ihre Ursache in der Proteolyse der extrazellulären Matrix durch Proteinase und aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinase-Signaltransduktion (z.B. MAPK-, PI3K-, HGF/Met-Signalwege). Proliferation und Neo-Angiogenese im Zielorgan werden durch eine Vielzahl verschiedener Wachstumsfaktoren reguliert (z.B. EGF, VEGF, TGF- $\beta$ ).<sup>51,60-63</sup>

Die Interaktion der metastasierenden Tumorzelle mit der Mikroumgebung des Zielorgans nimmt eine Schlüsselstellung im Metastasierungsprozess ein. Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen des Stromas sezernieren Wachstumsfaktoren und Proteinase und fördern somit Überleben und Proliferation der Metastase.<sup>64-67</sup> Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die Prozesse der Metastasierung und die zugrunde liegenden molekularen Alterationen.

Metastasierungsprozess/ Kennzeichen der metastatischen Zelle	beteiligte Proteine alterierte Signaltransduktionswege
Disseminierung aus dem Zellverband/ Verlust der Adhäsion	Cadherine (Zell-Zell-Adhäsion) Integrine, CD44 (Zell-Matrix-Adhäsion) FAK-Signalweg (Umgehung der Anoikis)
Invasion und Intravasation/ Proteolyse der ECM	extrazelluläre Proteinase (MMPs, uPA, Heparanase)
Migration/Motilität	MAPK-, PI3K-, HGF/Met-, Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwege
Überleben	IGF, PI3K-Signalweg
Arrest und Extravasation am Zielorgan	Selektine, Integrine Chemokine/Chemokin-Rezeptoren (CXCR4)
Proliferation und Neo-Angiogenese im Zielorgan	Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , VEGF, bFGF, HGF, PDGF), Proteinase, Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwege

**Abb.1.4: Molekulare Grundlagen der Fernmetastasierung.**

Adhäsionsmoleküle, ECM-degradierende Enzyme und Wachstumsfaktoren haben Schlüsselfunktionen im Metastasierungsprozess. (Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert: bFGF: basic Fibroblast growth factor, ECM: Extracellular matrix, EGF: Epidermal growth factor, Fak: Focal adhesion kinase, HGF: Hepatocyte-growth-factor, IGF: Insulin-like growth factor, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, MMP: Matrix metalloproteinase, PDGF: Platelet-derived growth factor, PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase, TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$ , uPA: urokinase Plasminogen Activator, VEGF: Vascular endothelial growth factor).<sup>43,61,63,64</sup>

## 1.4 Die Prognose der Metastasierung

Die Hälfte aller Tumorkranken entwickeln postoperativ Metastasen oder Rezidive - häufig sogar Jahre nach Resektion des Primärtumors. Diese Patienten haben eine schlechte Überlebensprognose. Die Behandlungsoptionen für dieses Stadium der Erkrankung sind sehr limitiert und haben meist palliativen Charakter.<sup>68,69</sup>

Die adjuvante Chemotherapie kann das Risiko einer Fernmetastasierung reduzieren, ist aber aufgrund der hohen Nebenwirkungen nicht für alle Patienten indiziert.<sup>68</sup> Es ist also zwingend notwendig, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine möglichst präzise Prognose zum Krankheitsverlauf und insbesondere zur Metastasierungswahrscheinlichkeit zu geben. Dies würde die Unterscheidung von Hoch- und Niedrig-Risikopatienten und eine dementsprechend angepasste, individuelle Therapie ermöglichen.

Die Prognose für das Kolonkarzinom wird unter anderem durch Faktoren wie Alter und Geschlecht des Patienten und Lokalisierung des Tumors bestimmt. Als Kennzeichen mit der höchsten prognostischen Relevanz gilt heute die regionale Lymphknoten-Metastasierung. Dieses Kriterium bildet demnach eine der Grundlagen aller gängigen Tumor-Klassifikationssysteme.<sup>70</sup>

### 1.4.1 Das System der TNM-Klassifikation

Zum Zeitpunkt der Diagnose wird der Tumor nach den Richtlinien der UICC (Union internationale contre le cancer) und AJCC (American Joint Committee on Cancer) klassifiziert.<sup>71,72</sup> Das TNM-System nimmt eine histopathologisch basierte Einteilung der Tumoren entsprechend des Progressionsstatus vor. Die zugrunde liegenden Parameter sind: Infiltration des Primärtumors in das umliegende Gewebe (T), Befall der regionalen Lymphknoten durch Metastasen (N) und Metastasierung des Primärtumors in distante Organe (M). Die TNM-Klassifikation bildet die Grundlage für die Stadieneinteilung der Tumoren (Abb. 1.5). Die Prognose für den Patienten ist abhängig vom Stadium der Tumorprogression und vor allem vom Metastasierungsstatus distanter Organe.<sup>4</sup> Die TNM-Klassifikation erfasst diese Parameter detailliert und bietet daher die Möglichkeit, eine Aussage über den Krankheitsverlauf des Patienten zu treffen. Sie wird weltweit in der klinischen Praxis als bisher zuverlässigster prognostischer Marker, z.B. für die Therapieplanung, angewandt.

UICC/AJCC Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4	N0	M0
IIIa	T1-T2	N1	M0
IIIb	T3-T4	N1	M0
IIIc	T1-T4	N2	M0
IV	T1-T4	alle N	M1

Grundlagen der TNM-Klassifikation			
T	Primärtumor	Tis	Carcinoma in situ/nur Tunica Mucosa betroffen
		T1	Tumor infiltriert Submucosa
		T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
		T3	Tumor infiltriert Subserosa
		T4	Tumor infiltriert umliegende Organe
N	Regionale Lymphknoten	N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
		N1	1-3 regionale Lymphknotenmetastasen
		N2	Metastasen in 4 oder mehr reg.Lymphknoten
M	distante Metastasen	M0	keine distanten Metastasen
		M1	distante Metastasen

**Abb. 1.5: Klassifikation des Kolonkarzinoms nach dem TNM-System.**

Erfasst werden die Prognose-relevanten, histopathologischen Parameter Tumorinfiltration (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M). Die TNM-Klassifikation bildet heute die klinische Grundlage für die Therapieplanung und die Überlebensprognose des Patienten. Die Tabelle gibt die seit 2003 gültige, sechste überarbeitete Fassung der UICC/AJCC Richtlinien wieder. <sup>4,71</sup>

#### 1.4.2 Molekulare Marker für die Metastasierungsprognose

Es hat sich gezeigt, dass die Klassifikation nach dem rein histopathologisch basierten TNM-System limitiert ist bei Patienten mit intermediären Progressionsstadien (UICC II-III). <sup>68,73</sup>

Außerhalb klinischer Studien wird der Einsatz adjuvanter Chemotherapie nach dem Nodalstatus des Patienten entschieden: Für Patienten mit Tumoren im UICC Stadium III gehört die adjuvante Therapie zur standardisierten Behandlung. <sup>47,68</sup> Eine klinische Studie wies jedoch nach, dass fast die Hälfte dieser Patienten die Chemotherapie unnötig erhält. <sup>70,74</sup>

Bei Patienten im UICC Stadium II ist der Einsatz adjuvanter Chemotherapie dagegen derzeit umstritten. Klinische Studien zeigten bisher uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich des Überlebensvorteils für den Patienten durch die Therapie. <sup>68,75</sup> Bei 30-40% der Lymphknoten-negativen Patienten kommt es jedoch zu einem Wiederauftreten des Tumors oder Metastasierung. <sup>73,76</sup> Die Identifizierung dieser Hochrisiko-Patienten, auch schon im frühen Stadium der Tumorprogression, ist also von zentraler Bedeutung.

Die molekularen Mechanismen der Tumorprogression sind heute gut charakterisiert. Es wird immer deutlicher, dass die genetische Heterogenität des Kolonkarzinoms großen Einfluss auf die Prognose in den Subklassen des

TNM-Systems hat. Mehrere klinische Studien zeigen eine Korrelation z.B. epigenetischer Marker mit dem Ansprechen auf die Therapie und dem Überleben des Patienten.<sup>77-80</sup> Dies zeigt, dass es dringend notwendig ist, zusätzliche molekulare Marker für die Prognose zu etablieren. Diese würde eine genauere Differenzierung von Risikogruppen innerhalb der klassischen Stadien ermöglichen, die mit histopathologischen Parametern nicht zu erfassen sind. Viele der in Tumorprogression und Metastasierung identifizierten Gene wurden auf ihre Relevanz als Prognosemarker hin untersucht. Hierzu gehören Onkogene und Tumorsuppressorgene genauso wie Gene, die in die Metastasierung involviert sind.<sup>5,70,73,81,82</sup> Die meisten Studien fokussierten auf die prognostische Qualität einzelner molekularer Marker. In wenigen Studien wurden dagegen kleine Gruppen potentieller Prognosefaktoren in einer Kombinationsanalyse untersucht.<sup>83,84</sup> Neben diesen Genanalysen wurden auch epigenetische Alterationen von Tumorzellen, wie MSI oder der Verlust bestimmter chromosomaler Abschnitte auf prognostische Relevanz hin geprüft.<sup>85-87</sup> Abbildung 1.6 gibt einen Überblick über die meist-diskutierten Kandidatengene.

Potentielle, molekulare Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms	
Onkogene	K-Ras, c-Myc, TGF- $\beta$ , ErbB2, EGFR, $\beta$ -Catenin, Bcl-2
Tumorsuppressorgene	p53, APC, DCC, Smad2/4
Proliferationsmarker	PCNA, Ki-67
Adhäsion	E-Cadherin, CD44, sLe <sup>X</sup>
Proteolyse	MMPs, uPA, TIMP-1
Angiogenese	VEGF
Migration/ Invasion	HGF, Met, S100A4
Nukleinsäure-Metabolismus	Thymidin-Phosphorylase, Thymidin-Synthase
Epigenetische Marker	MSI, LOH (5q,17p,18q), Hypermethylierung
Serummarker in der Diagnostik	CEA, CA 19-9

**Abb. 1.6: Molekulare, prognostische Marker für das Kolonkarzinom.**

Die Übersicht zeigt die wichtigsten Kandidatengene, die sich derzeit in der Evaluierung befinden. Aufgrund unzureichender Evidenz findet jedoch bisher keiner dieser Parameter in der klinischen Praxis als Prognosemarker Anwendung.<sup>88,89</sup> (Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert: Bcl-2: B-cell lymphoma protein 2, CEA: Carcinoembryonic antigen, PCNA: Proliferating cell nuclear antigen, sLe<sup>X</sup>: Sialyl Lewis<sup>X</sup> antigen, TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1)

Auch wenn einzelne, viel versprechende Studien vorliegen, so konnte bisher für keinen der analysierten Marker ein valider prognostischer Wert bestätigt werden. Allein zu dem Tumorsuppressor p53 bestehen eine Vielzahl von Studien mit völlig kontroversen Ergebnissen, die eine klare Einschätzung der tatsächlichen Qualität der Prognose schwierig machen.<sup>70</sup> So gibt es derzeit für keinen einzigen der getesteten Marker eine Empfehlung für die prognostische Anwendung in der Klinik durch die EGTM (European Group on Tumour Markers) oder die ASCO (American Society of Clinical Oncology).<sup>88-90</sup> Neue Ansätze bedienen sich der Microarray-Technologie bzw. der Proteomics zur Identifizierung prognostischer Genexpressionsprofile.<sup>39,91-95</sup> Die

vorliegenden Analysen zeigen jedoch nur geringe Übereinstimmungen in den ermittelten Signaturen, so dass die Validierung eines verlässlich reproduzierbaren, prognostischen Expressionsprofils zurzeit problematisch erscheint.<sup>96,97</sup> Eine ausgereifte Diagnostik des molekularen Status des Patienten wird jedoch immer dringender notwendig, nicht nur für die Prognose, sondern auch wegen des zunehmenden Einsatzes molekularer Therapien. Die neuen, genspezifischen Therapeutika können nur sinnvoll angewandt werden, wenn über den Mutations- und Expressionsstatus des Zielproteins Klarheit besteht.<sup>82</sup>

Am vielversprechendsten für den klinischen Einsatz erscheint derzeit eine Kombination der TNM-Klassifikation mit mehreren molekularen Markern oder gar einer Gensignatur für die spezifische Risikoeinschätzung des Patienten und eine individualisierte Therapie. Im Vordergrund stehen deshalb heute die Validierung der vorhandenen Kandidatengene in großen klinischen Studien und die Identifizierung neuer molekularer Marker mit Potential für die Metastasierungsprognose.

## **1.5 Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) und sein Rezeptor Met**

Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) und sein Rezeptor Met sind zwei vielversprechende Kandidatengene als prognostische Marker für die Metastasierung. Der HGF/Met-Signalweg steuert sowohl in der Embryogenese als auch in der Tumorigenese invasives Wachstum und Proliferation. Mehrere Studien zeigten eine Überexpression von HGF und/oder Met im Kolonkarzinom und wiesen eine Assoziation mit dem Tumorprogressionsstadium und der Metastasierungswahrscheinlichkeit nach.<sup>98-100</sup>

### **1.5.1 Der Hepatocyte-growth-factor (HGF)**

HGF wurde in parallelen Arbeiten isoliert als ein Wachstumsfaktor für Hepatozyten (Hepatocyte-growth-factor/HGF) bzw. als ein von Fibroblasten sekretierter Motilitätsfaktor (Scatter-factor/SF).<sup>101-104</sup> Die HGF-Domänenstruktur ist typisch für Proteinase der Plasminogen-Familie. Das durch Disulfidbrücken verbundene Heterodimer enthält eine N-terminale Domäne (N), vier Kringle-Domänen (K1-K4) und eine inaktive Serin-Proteinase-Homologie-Domäne (SPH). Der N-terminale Abschnitt NK1 ist für die Rezeptorbindung verantwortlich.<sup>105-107</sup>

### **1.5.2 HGF ist der Ligand der Rezeptor-Tyrosinkinase Met**

Met wurde ursprünglich als Onkogen identifiziert.<sup>108</sup> Dabei handelte es sich um Tpr-Met (Translocated promoter region fused to Met), ein konstitutiv aktives Fusionsprotein aus Met und einer Dimerisierungsdomäne. Kurze Zeit später gelang der Nachweis, dass die Tyrosinkinase als Rezeptor des Wachstumsfaktors HGF fungiert.<sup>109</sup>

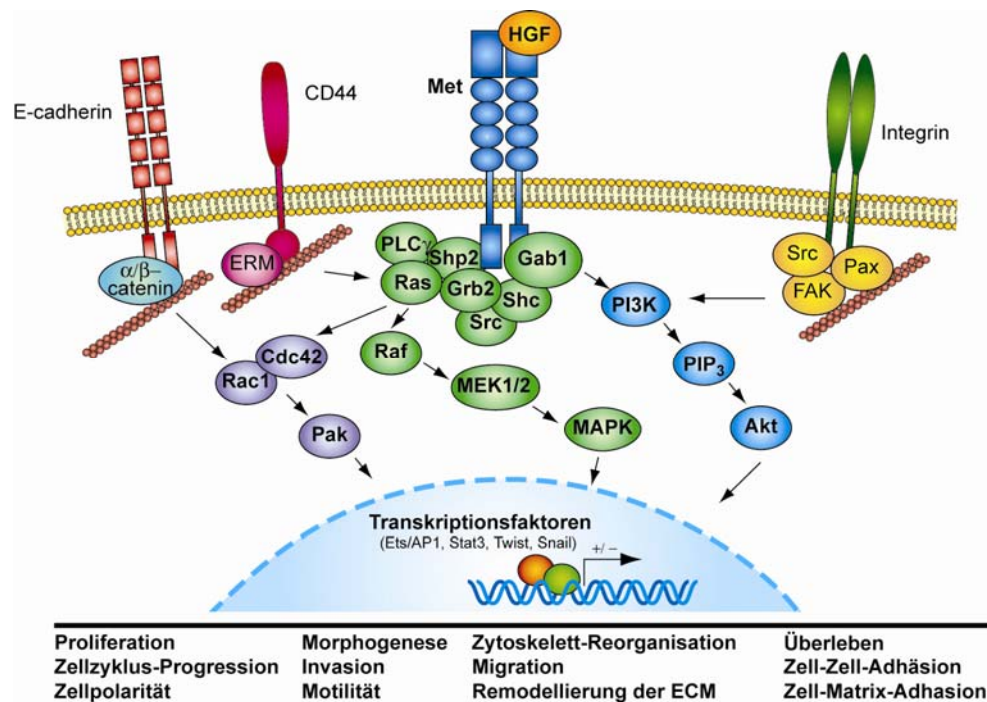
Das reife Protein besteht aus einer 50 kDa extrazellulären  $\alpha$ -Kette und einer transmembranen 145 kDa  $\beta$ -Kette, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die  $\alpha$ -Kette und terminale Bereiche der  $\beta$ -Kette bilden



gemeinsam die Sema-Domäne, ein Motiv das typisch ist für Semaphorin-Axon-Guidance-Proteine. Dieser Bereich ist verantwortlich für die Ligandenbindung.<sup>110</sup> Die Ektodomäne der  $\beta$ -Kette enthält zusätzlich ein kurzes Cysteinreiches Motiv und vier Immunglobulin-Domänen. Der intrazelluläre Abschnitt trägt die Kinase-Domäne und den für die Signaltransduktion essentiellen C-Terminus mit mehreren Tyrosin-Phosphorylierungsstellen.<sup>105,111</sup>

### 1.5.3 Der HGF/Met-Signalweg

Der HGF/Met-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und Wundheilung, aber auch in der Tumorprogression und Metastasierung.<sup>112-115</sup> Er reguliert Proliferation, Motilität, Zellpolarität, Adhäsion und Invasivität, Angiogenese und das Überleben der Zelle. Die Bindung des Liganden HGF führt zur Dimerisierung des Rezeptors, Autophosphorylierung und Assemblierung eines Komplexes aus Kinasen und Adapterproteinen, die die Signaltransduktionskaskaden initiieren (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7: Der HGF/Met-Signalweg.**

HGF-Bindung führt zur Aktivierung des Rezeptors Met und zur Rekrutierung von Adaptermolekülen, die verschiedene Signaltransduktionskaskaden (v.a. MAPK- und PI3K-Signalwege) initiieren. Der HGF/Met-Signalweg interagiert mit einer Reihe weiterer Signaltransduktionskaskaden und Adhäsionsmolekülen wie Integrinen, CD44 oder E-Cadherin und vermittelt so eine komplexe zelluläre Antwort, die Motilität, Proliferation und Überleben reguliert. (Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert: ERM: Ezrin/radixin/moesin, MEK1/2: MAPK/ERK kinases 1/2, Pax: Paxillin, PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PLC $\gamma$ : Phospholipase C  $\gamma$ ). Modifiziert nach Birchmeier et al., Christofori, Maulik et al., Zhang et al.,<sup>6,105,114,116</sup>



Die phosphorylierten Tyrosine Y 1349 und Y 1356 im C-Terminus von Met sind Bindestellen für Signalmoleküle wie Gab1 (growth-factor receptor-bound protein 2 (Grb2) associated binder 1), Grb2 (growth-factor receptor-bound protein 2), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Src, Shc (Src-homology-2 (SH2)-domain-containing) und Shp2 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2). Das Met-spezifische Adapterprotein Gab1 nimmt eine Schlüsselfunktion ein. Aktiviertes Gab1 rekrutiert eine Reihe nachgeschalteter Signalmoleküle und ist hauptverantwortlich für die Vermittlung der HGF-induzierten Signale.<sup>117,118</sup> HGF/Met Signale aktivieren verschiedene Signaltransduktionskaskaden, vor allem den über Ras vermittelten MAPK-Signalweg und den PI3K/Akt-Signalweg. MAPK-Signale aktivieren Ets/AP1-Transkriptionsfaktoren, steuern Proliferation, Adhäsion und Motilität. Die ebenfalls über Ras aktivierte Pak (p21/Cdc42/Rac1-activated kinase) reguliert die zytoskeletale Reorganisation und Zell-Zell-Adhäsion. Der PI3K/Akt-Signalweg steuert vorrangig Überleben und Apoptose. Met interagiert mit einer Vielzahl anderer Rezeptoren und Adhäsions-vermittelnden Proteinen wie dem EGF-Rezeptor, CD44, Integrinen und E-Cadherin. Außerdem wurden Interaktionen mit JNK (Jun amino-terminal kinase), Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3), NF-κB (Nuclear factor κB), den Wnt/β-Catenin und Notch-Signalwegen nachgewiesen.<sup>119,120</sup> Somit wird deutlich, dass ein weit verzweigtes Netzwerk unterschiedlicher Signalkaskaden für die komplexe zelluläre Antwort auf HGF/Met-Signale verantwortlich ist.

#### 1.5.4 Der HGF/Met-Signalweg induziert das invasive Wachstum

Der HGF/Met-Signalweg induziert in epithelialen Zellen die Transition zum mesenchymalen Phänotyp.<sup>121</sup> Die Zellen zeigen nach HGF-Induktion Änderungen der Zellpolarität und Adhäsion, erhöhte Proliferation und Invasivität. Das durch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) gesteuerte invasive Wachstum hat eine Schlüsselfunktion in der Embryogenese, z.B. bei der Bildung tubulärer Strukturen in der Organogenese und Angiogenese.<sup>121-124</sup>

Die HGF/Met gesteuerte Aktivierung von Integrinen und nachgeschalteten Kinasen wie Src und FAK (Focal adhesion kinase) führt zu Modifikationen der Adhäsion und des Zytoskeletts, Umgehung der Anoikis und einer zusätzlichen Verstärkung des HGF/Met-Signals. Die Remodellierung der Adherens-Junctions durch Suppression von E-Cadherin und die Induktion ECM-degradierender Proteinasen durch die EMT sind eine weitere zelluläre Ursache für den hochmotilen, invasiven Phänotyp.<sup>122</sup>

Die EMT als Voraussetzung für invasives Wachstum gilt heute als ein grundlegender Mechanismus für die Tumorprogression und Metastasierung. Disseminierte, invasive Tumorzellen zeigen ebenfalls eine Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp mit verminderter Differenzierung, Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, hoher Motilität und Invasivität. Es sind weitestgehend die gleichen Signaltransduktionskaskaden und zellulären Alterationen involviert, die auch der EMT in der Embryogenese zugrunde liegen.<sup>122,125-127</sup> Der HGF-Rezeptor Met ist demnach ein potentiell Schlüsselmolekül im Metastasierungsprozess.<sup>125</sup>

### 1.5.5 HGF/Met-Expression im Kolonkarzinom

Eine Dysregulation des HGF/Met-Signalwegs wurde inzwischen für viele Tumorentitäten nachgewiesen, so in Karzinomen der Brust, Lunge, Leber und auch des Kolons.<sup>116</sup> Neuere Ergebnisse bestätigen eine Schlüsselfunktion der Rezeptor-Tyrosinkinase in der Regulation von Tumorinvasion und Metastasierung.<sup>105,125</sup>

In den meisten Fällen liegt eine Überexpression des Rezeptors vor, z.B. durch Genamplifikation oder Induktion der Expression durch andere Onkogene wie K-Ras. Hohe Expressionsniveaus führen zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der Signaltransduktion. Außerdem wurden eine Reihe Mutationen im Bereich der regulatorischen Phosphorylierungsstellen identifiziert, die zu einer erhöhten, unregulierten Aktivität des Rezeptors führen.<sup>128,129</sup> Das transformierte Onkogen Tpr-Met zeigt eine konstitutive Dimerisierung und somit Aktivierung des Rezeptors. Im Normalgewebe aktiviert der von Fibroblasten des Stromas sekretierte HGF den epithelialen Met-Rezeptor auf parakrine Weise. Einige Tumorentitäten exprimieren jedoch sowohl den Rezeptor, als auch den Liganden. Durch diesen autokrinen Mechanismus machen sich die Tumorzellen unabhängig von externen Wachstumssignalen.<sup>105,130,131</sup>

Mehrere Arbeiten wiesen in Tumorgeweben von Kolonkarzinom-Patienten eine Met-Überexpression nach. Diese war assoziiert mit erhöhtem Tumorwachstum, Invasivität und metastatischem Potential.<sup>98,132,133</sup> Erste Studien zur Relevanz der HGF- und/oder Met-Expression für die Metastasierungsprognose zeigten eine signifikante Korrelation der Met-Überexpression mit distanter Metastasierung und verringertem Gesamtüberleben.<sup>99,100</sup>

## 1.6 MACC1: Identifizierung eines neuen Metastasierungs-assoziierten Genes

### 1.6.1 MACC1 ist differentiell exprimiert in distanten Metastasen des Kolonkarzinoms

Mit der Zielstellung neue prognostische Marker für die Kolonkarzinom-Metastasierung zu identifizieren, wurden in der Arbeitsgruppe Stein/Walther am MDC-Berlin Differential-Display RT-PCR Analysen von Gewebeproben normaler Mucosa, von Primärtumoren und deren Fernmetastasen durchgeführt (H. Schwabe).<sup>134</sup> Die differentielle Expression der isolierten cDNA-Fragmente wurde zunächst mittels qRT-PCR Analyse totaler RNA der Gewebeproben sowie *in situ*-Hybridisierung histologischer Präparate validiert. Eines der cDNA-Fragmente, die eine deutliche Überexpression in metastatischen Geweben zeigten, wies beim Abgleich mit den Datenbanken keine Sequenzübereinstimmung mit bisher bekannten Genen auf. Es erhielt die vorläufige Bezeichnung 7a5. Da mit Hilfe des Differential-Display nur kurze cDNA Fragmente isoliert werden können, erfolgte die Identifizierung der vollständigen Sequenz dieses Kandidatengens mittels EST-Clustering und 5'RACE-Technologie.<sup>134</sup> Die vollständige mRNA-Sequenz ist unter der Bezeichnung „Homo sapiens mRNA for putative binding protein 7a5“ in der NCBI Datenbank verfügbar (Gen-ID: 346389, AC# AJ313524; www.ncbi.nlm.nih.gov). Sie hat eine Länge von 2559 Basenpaaren und kodiert

für ein 97 kDa großes Protein (852 Aminosäuren). Datenbankanalysen sagen eine Lokalisation des putativen Proteins zu 43,5% im Cytoplasma und zu 21,7% im Zellkern voraus (<http://psort.nibb.ac.jp>).

Für das neu identifizierte Gen wurde beim „HUGO Gene Nomenclature Committee“ der Name MACC1-„Metastasis-Associated in Colon Cancer 1“ beantragt und bereits bewilligt ([www.genenames.org](http://www.genenames.org)).

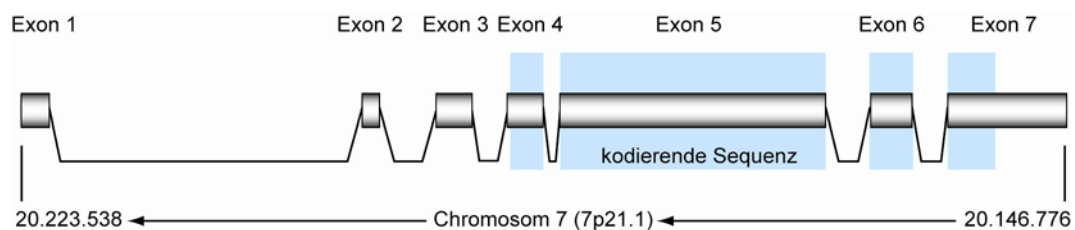
### 1.6.2 Genomische Organisation des Gens MACC1

Mit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des humanen Genomprojektes steht auch die vollständige genomische MACC1-Sequenz zur Verfügung. MACC1 ist auf dem Minus-Strang des Chromosoms 7 im Locus 20.146.776 bis 20.223.538 (7p21.1) codiert.<sup>135</sup> Die genomische DNA-Sequenz ist organisiert in 7 Exons und 6 Introns (Abb.1.8). Die 2559 Protein-kodierenden Basen liegen in den Exons 4,5,6 und 7 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Bisher konnte nur ein humanes Protein mit Strukturhomologien zu MACC1 identifiziert werden: SH3BP4 (SH3-binding protein 4), auch bezeichnet als TTP (Transferrin receptor trafficking protein). Das 963 Aminosäuren große Protein wurde in kultivierten Fibroblasten der Cornea identifiziert und reguliert die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors (TfR) an Clathrin-coated-pits.<sup>136,137</sup>

Die Sequenzhomologie wurde sowohl auf der Nukleotid-, als auch auf der Proteinebene analysiert. Sie beträgt 49,3% (Nukleotide/Nt) bzw. 43,7% (Aminosäuren/As), ist also eher gering ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Die Analyse der MACC1-Orthologe zeigte, dass das Gen in der Klasse der Säugetiere auffallend konserviert ist. So konnten putative MACC1 Orthologe mit hoher Sequenzidentität in *P. troglodytes* (99,2% Nt/ 98,3% As), *C. familiaris* (87,4% Nt/ 81,4% As), *R. norvegicus* (81,6% Nt/ 77,4% As) und *M. musculus* (81,6% Nt/ 76,3% As) identifiziert werden.



**Abb. 1.8: Genomische Organisation von MACC1 (schematische Darstellung).**

Die 7 Exons und 6 Introns des Gens sind auf dem Minus-Strang des Chromosoms 7 (7p21.1) lokalisiert. Die Exons 4, 5, 6 und 7 tragen die 2559 bp Protein-kodierende Sequenz ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

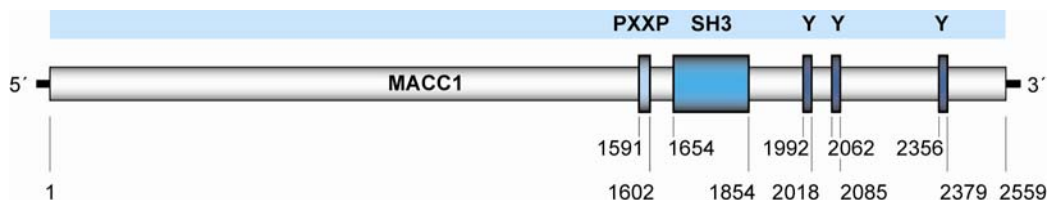
### 1.6.3 Putative Domänenstruktur des Proteins

Mit Hilfe von *in silico* Analysen konnten in MACC1 mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Abb. 1.9). Die globuläre SH3-Domäne (Src-homology 3 domain) wurde

erstmalig charakterisiert in Src, dem ersten beschriebenen Proto-Onkogen. Src ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die an der Regulation von Motilität, Proliferation und Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist.<sup>138,139</sup> Src vermittelt die Signale von membrangebundenen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrinen durch Protein-Protein-Interaktion (SH2- und SH3-Domänen) und Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen oder Adapterproteine vor allem über die MAPK-, PI3K- und Stat-Signalwege.<sup>138</sup> Die SH3-Domäne ist ein häufig auftretendes Motiv unter Signaltransduktionsmolekülen. So wurden allein in 27 Protein-Kinasen SH3-Domänen nachgewiesen.<sup>140</sup>

Neben der SH3-Domäne weist MACC1 ein Prolin-reiches Motiv PXXP auf. Diese weit verbreiteten Prolin-reichen Sequenzen (Konsensus-Sequenz: (R/K)XXPXXP) sind häufig beteiligt an der Assemblierung von Signalmolekül-Komplexen.<sup>141,142</sup> PXXP-Strukturen bilden das Erkennungsmotiv von SH3-Domänen. In MACC1 treten diese beiden Domänen gepaart auf und ermöglichen somit eine stabile bidirektionale Interaktion mit potentiellen Bindungspartnern.

MACC1 trägt im C-terminalen Bereich drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Die gesteuerte, reversible Phosphorylierung von Tyrosinresten ist eine der zentralen Mechanismen der zellulären Signaltransduktion.<sup>140</sup> Die Tyrosinreste, bzw. die umgebende Konsensussequenz der Substrate sind Bindestellen für SH2-Domänen oder PTB-Domänen (Phosphotyrosin-Bindedomäne) enthaltende Kinasen oder Adaptermoleküle. Bisher sind im humanen Genom mehr als 90 transmembrane und cytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen charakterisiert worden. Hierzu gehören auch eine Vielzahl Proto-Onkogene, deren deregulierte Signaltransduktion eine Ursache für die Tumorentstehung bildet.<sup>143,144</sup>



**Abb. 1.9: Putative Domänenstruktur von MACC1.**

Das Protein verfügt über eine SH3-Domäne und eine Prolin-reiche Sequenz (PXXP). Beide Motive vermitteln Protein-Protein-Interaktion. Zusätzlich wurden drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die Kombination der verschiedenen Struktur motive deutet auf eine zelluläre Funktion von MACC1 in der Signaltransduktion hin.

Neben diesen Domänen sind in MACC1 eine Reihe weiterer putativer Protein-Protein-Interaktionsdomänen identifiziert worden (<http://elm.eu.org>). Hierzu gehören z.B. Bindemotive für EH-Domänen (Eps15 homology domain) und für SH2-Domänen enthaltende Proteine. Die MACC1-Domänenstruktur ist vorerst prädiktiv und bedarf der molekularbiologischen Validierung. Die Kombination der *in silico* identifizierten Struktur motive liefert jedoch Hinweise, dass das neu identifizierte Gen mittels Protein-Protein-Interaktion und Tyrosin-Phosphorylierung an zellulären Signaltransduktionswegen beteiligt ist.

## 1.7 Zielstellung der Arbeit

MACC1 (Metastasis-Associated in Colon Cancer) ist ein neu identifiziertes Gen, das in humanen Kolonkarzinomen und deren Metastasen überexprimiert wird.<sup>134</sup> Diese hohe Expression in malignen Geweben lässt vermuten, dass MACC1 eine wichtige Funktion in der Tumorigenese hat. Die *in silico* identifizierte, putative MACC1-Domänenstruktur weist auf eine Rolle des Proteins in Signaltransduktionskaskaden, z.B. von Rezeptor-Tyrosinkinasen, hin.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der zellulären Funktion von MACC1 und seiner Rolle in Tumorprogression und Metastasierung des Kolonkarzinoms. Der Einfluss von MACC1 auf metastasierungs-assoziierte zelluläre Parameter wie Migration, Invasivität und Proliferation von Tumorzellen wurde in entsprechenden funktionellen *in vitro* Assays und im Tiermodell analysiert.

Um die Bedeutung der identifizierten Strukturmodelle für die Funktion des Proteins zu analysieren, wurden Mutationsvarianten ausgewählter MACC1-Protein-Protein-Interaktionsdomänen generiert und getestet.

Um die Fragestellung nach einer Beteiligung von MACC1 an Metastasierungs-assoziierten Signaltransduktionswegen aufzuklären, wurden Wachstumsfaktoren und Inhibitoren von Signalmolekülen eingesetzt. Dies führte zum Nachweis der regulatorischen Funktion von MACC1 im HGF/Met-Signalweg und der Identifizierung des HGF-Rezeptors Met als transkriptionelles MACC1-Zielgen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der MACC1-Expressionsanalyse im Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten, mit dem Ziel, den Wert von MACC1 als molekularen prognostischen Marker für die Metastasierung zu evaluieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Expressionsvektoren, Oligonukleotide, Antikörper

#### 2.1.1 Eukaryotische Expressionsvektoren

**Tab. 2.1: verwendete eukaryotische Expressionsvektoren.**

<b>MACC1 Expressionsvektoren</b>	<b>Eigenschaften</b>
pcDNA3.1D/MACC1-V5His	wt MACC1 mit V5- und His-Tag
pcDNA3.1D/MACC1 $\Delta$ SH3-V5His	Deletion der SH3-Domäne
pcDNA3.1D/MACC1PXXP <sup>mut</sup> -V5His	Mutagenese des PXXP-Motivs
pcDNA3.1D/MACC1 $\Delta$ SH3PXXP <sup>mut</sup> -V5His	Deletion der SH3-Domäne Mutagenese des PXXP-Motivs
pcDNA3.1D/lacZ-V5His	Vektorkontrolle für stabile Transfektanten (Invitrogen, Karlsruhe)
<b>Vektoren für die Met-Promotoranalyse</b>	
pCAT3Basic	Promotorloser CAT-Vektor (Promega GmbH, Mannheim)
pCAT3-Control	CAT-Expressionsvektor mit SV40 Promotor (Promega)
pCAT3-2,6met	CAT-Reportervektor mit 2,6 bp Met-Promotorfragment
pCAT3-1,1met	CAT-Reportervektor mit 1,1 bp Met-Promotorfragment
pCAT3-0,7met	CAT-Reportervektor mit 0,7 bp Met-Promotorfragment
pCAT3-0,4met	CAT-Reportervektor mit 0,4 bp Met-Promotorfragment
pCAT3-0,2met	CAT-Reportervektor mit 0,2 bp Met-Promotorfragment
pCAT3-0,1met	CAT-Reportervektor mit 0,1 bp Met-Promotorfragment

Die Met-Promotorkonstrukte wurden von Y. Liu (University of Pittsburgh, PA, USA) zur Verfügung gestellt. 145

## 2.1.2 Oligonukleotidsequenzen

### Ortsgerichtete Mutagenese

**Tab. 2.2: Für die Mutagenese des PXXP Motivs verwendete Oligonukleotide.**

Template→ generierter Vektor	Mutagenese- Oligonukleotide 5'→3'	eingeführte Mutation
pcDNA3.1D/MACC1→ pcDNA3.1D/MACC1/PXXP  pcDNA3.1D/MACC1/SH3→ pcDNA3.1D/MACC1/SH3- PXXP	Sense: GGA GGA AAT CAA GTC TGC TGC TTT ATC AGC AAA AAT TCT TGT TAA ATA TCC Antisense: GGA TAT TTA ACA AGA ATT TTT GCT GAT AAA GCA GCA GAC TTG ATT TCC TCC	CCT TTA TCA CCA → GCT TTA TCA GCA  (PXXP→AXXA)

### RNA-Interferenz

**Tab. 2.3: Sequenzen der verwendeten siRNA-Oligonukleotide.**

Zielgen	siRNA	mRNA Zielsequenz 5'→3'	siRNA Sequenzen 5'→3'
MACC1	MACC1 si#4	AAG AUU GGA CUU GUA CAC UGC	sense: GAU UGG ACU UGU ACA CUG Ctt antisense: GCA GUG UAC AAG UCC AAU Ctt
MACC1	MACC1 si#5	AAG CUU GGA AAA GGC UGG AGG	sense: GCU UGG AAA AGG CUG GAG Gtt antisense: CCU CCA GCC UUU UCC AAG Ctt
Met	Met si#38	GGC ACT AGC AAA GTC CGA G	sense: GGC ACU AGC AAA GUC CGA Gtt antisense: CUC GGA CUU UGC UAG UGC Ctc Silencer® Validated siRNA (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt)
Met	Met si#40	AUC UUU CAU GAU GAU UCC C	sense: GGG AAU CAU CAU GAA AGA Utt antisense: AUC UUU CAU GAU GAU UCC Ctc Silencer® Validated siRNA (Ambion)
	Kontroll- si#1	Silencer® Negative control#1 siRNA (Ambion)	

**Quantitative real-time RT-PCR, PCR****Tab. 2.4: Sequenzen der verwendeten Primer und Hybridisierungs sonden.**

<b>Primer/Sonde</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
MACC1 fwd	TTC TTT TGA TTC CTC CGG TGA
MACC1 rev	ACT CTG ATG GGC ATG TGC TG
MACC1 FITC	GCA GAC TTC CTC AAG AAA TTC TGG AAG ATC TA-FITC
MACC1 LCRed640	LCRed640-AGT GTT TCA GAA CTT CTG GAC ATT TTA GAC GA
Met fwd	ATA CGG TCC TAT GGC TGG TG
Met rev	TTT AAC AGC AAA CTC AGT TGA AAT G
Met FITC	GAA AAA CAT GTA CTT TAA AAA GTG TGT CAA ACA G-FITC
Met LCRed640	LCRed640-ATT CTT GAA TGT TAT ACC CCA GCC CAA A
HuSat fwd	GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G
HuSat rev	AAA CGT CCA CTT GCA GAT TCT AG
HuSat FITC	CTT CAC ATA AAA ACT ACA CAG ATG CAT TCT CAG G-FITC
HuSat LCRed640	LCRed640-CTT TTT GGT GAT GTT TGT ATT CAA CTC CAA G

**Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)/ PCR****Tab. 2.5: Sequenzen der in der Chromatin-Immunpräzipitation verwendeten Primer.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
ChIP Met Prom fwd	CTA ACT TCA GAC TGC CTG AGC
ChIP Met Prom rev	CAC CAC CCA GAG GGA AAT C
ChIP Fos Prom fwd	CCT TAA TAT TCC CAC ACA TGG C
ChIP Fos Prom rev	CTG CGT TTG GAA GCA GAA AGT



### 2.1.3 Antikörper

#### *Primäre Antikörper*

**Tab. 2.6: Verwendete primäre Antikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti V5 (Maus)	1:2000 inTBST/5%BSA	Invitrogen
anti human c-Met (Maus)	1:1000 inTBST/5%BSA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti human $\beta$ -Tubulin (Maus)	1:1000 inTBST/5%BSA	BD Biosciences, Heidelberg
anti human Histon H4 (Kaninchen)	1:1000 inTBST/5%BSA	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
anti human p44/42 MAPK (Kaninchen)	1:1000 inTBST/5%BSA	Cell Signaling Technology
anti phospho-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Kaninchen)	1:1000 inTBST/5%BSA	Cell Signaling Technology
anti human Akt (Kaninchen)	1:1000 inTBST/5%BSA	Cell Signaling Technology
anti phospho-Akt (Ser473) (Kaninchen)	1:1000 inTBST/5%BSA	Cell Signaling Technology
IgG Isotypen Kontrolle (Maus)	1:1000 inTBST/5%BSA	BD Biosciences

#### *Sekundäre Antikörper*

**Tab. 2.7: Verwendete sekundäre Antikörper.**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti Maus IgG-HRP	1:10000 in TBST/1%BSA	Pierce-Perbio, Bonn
anti Maus IgM-HRP	1:10000 in TBST/1%BSA	Sigma-Aldrich, München
anti Maus IgG-FITC	1:10000 in TBST/1%BSA	Biosource/ Invitrogen
anti Kaninchen IgG-HRP	1:10000 in TBST/1%BSA	Promega

## 2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.2.1 Klonierungen, Plasmidpräparationen

Die folgenden molekularbiologischen Methoden wurden nach Standardprotokoll durchgeführt:<sup>146,147</sup>

Für Klonierungen wurden Restriktionsenzyme, Ligasen und Phosphatasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Für DNA- und RNA Gelelektrophoresen mit 0,8-2% Agarosegelen (Electrophoresis Grade Agarose, Invitrogen, Karlsruhe) in TAE-Puffer wurden Horizon<sup>®</sup> Kammern (Biometra GmbH, Göttingen) verwendet. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel diente der Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit der Invitex GmbH (Berlin). Zur Transformation wurden chemisch kompetente Zellen des *Escherichia coli* Stamms DH5α nach Herstellerprotokoll verwendet (Subcloning Efficiency<sup>™</sup> DH5α<sup>™</sup> Chemically Competent Cells, Invitrogen). Analytische Plasmidpräparationen wurden mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitex GmbH, Berlin), quantitative Präparationen mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne) durchgeführt. Korrekte cDNA-Insertion in Expressionsvektoren wurde mittels Sequenzierung verifiziert (Invitex GmbH). Sequenzanalysen und Oligonukleotid-Designs wurden mit den Programmen Clone Manager 6, HUSAR (genome.dkfz-heidelberg.de) oder dem „Oligonucleotide Calculator“ (www.basic.northwestern.edu) durchgeführt.

PCRs mit Taq-Polymerase (Invitex GmbH) wurden auf dem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für Amplifikationen mit Proofreading-Polymerase wurde der Pwo Master Kit von Roche nach Herstellerprotokoll verwendet (Roche Applied Science, Mannheim). Alle Primer wurden von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert und HPLC gereinigt.

### 2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Ortsgerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des **QuikChange<sup>®</sup> II XL Site-Directed Mutagenesis Kits** (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der BioTeZ GmbH synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Das Primerdesign erfolgte mit dem Programm labtools von Stratagene (<http://labtools.stratagene.com/QC>). Die für die Mutagenesen verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tabelle 2.2. Alle Mutagenesen wurden mittels Sequenzierung überprüft (Invitex GmbH).

## 2.3 MACC1 Expressionsvektoren

### 2.3.1 Klonierung der MACC1 cDNA

Die humane MACC1 cDNA wurde im Labor der AG Stein/Walther (MDC Berlin) durch H. Schwabe mittels Differential-Display-RT-PCR-Analyse von Normalgewebe und Tumorseiten identifiziert.

Zur Klonierung der vollständigen, 2559 bp langen MACC1 cDNA wurde Gesamt-RNA der Kolonkarzinom-Zelllinie SW620 revers transkribiert, die MACC1 cDNA mittels PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO kloniert (pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen) (Abb.2.1). Die Expression von MACC1 als V5-His-Fusionsprotein ermöglicht die molekularbiologische Analyse mittels Tag-spezifischer Antikörper. Vollständige Sequenzierung der Expressionskassette des generierten Vektors *pcDNA3.1D/MACC1-V5His* zeigte eine 100%ige Übereinstimmung der klonierten cDNA mit dem entsprechenden, durch das Humane Genomprojekt identifizierten EST auf Chromosom 7 (7p21.1).<sup>148</sup>

### 2.3.2 Generierung der *MACC1ΔSH3*, *MACC1PXXP<sup>mut</sup>* und *MACC1ΔSH3PXXP<sup>mut</sup>* Domänen-Varianten

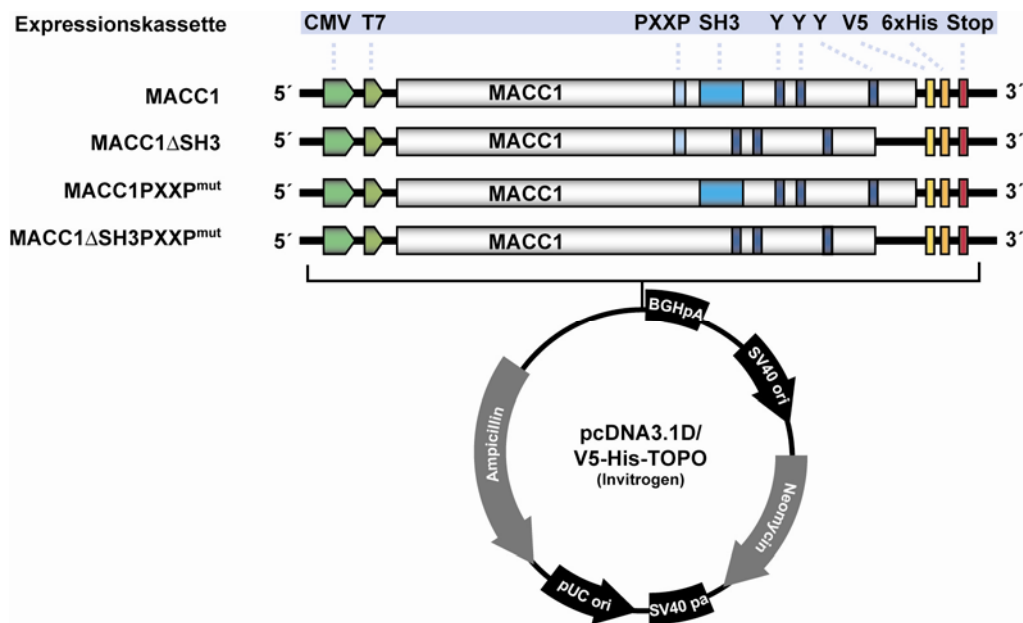
#### *MACC1ΔSH3*

Zur Generierung der SH3-Domänen Deletionsvariante wurden die *AarI* und die *Bsp1407I* Restriktionsschnittstellen in der MACC1 cDNA genutzt. *AarI* schneidet 278 bp 5' der SH3 Domäne, *Bsp1407I* 26 bp vor dem 3' Domänenende. Der forward-Primer (5'AAA TTA AAC AAA AGC AGT TGG AAG C3') wurde auf die *AarI* Schnittstelle gelegt, der reverse-Primer (5'CAG TGT ACA AGG GTT ACC CCA TAG TTG CTA AAG TTC 3') band an die Sequenz am 5' Domänenende und wurde am 3' Ende um eine *Bsp1407I* Schnittstelle ergänzt. Somit wurden 300 Basen 5' in der SH3-Domäne liegender Sequenz amplifiziert, flankiert durch die Restriktionsschnittstellen *AarI* und *Bsp1407I*.

Der Vektor *pcDNA3.1D/MACC1-V5His* und das PCR Produkt wurden mit *AarI* und *Bsp1407I* geschnitten, aufgereinigt und das PCR Produkt in den Vektor ligiert. Somit wurden unter Einhaltung des Leserasters 51 AS der 67 AS großen SH3-Domäne deletiert. Die verbleibende Sequenz wurde im SMART-Programm nicht mehr als SH3-Domäne identifiziert (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

#### *MACC1PXXP<sup>mut</sup>* und *MACC1ΔSH3PXXP<sup>mut</sup>*

Die Generierung der MACC1 Varianten –PXXP<sup>mut</sup> und –ΔSH3PXXP<sup>mut</sup> erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese des *pcDNA3.1D/MACC1-V5His*- bzw. des *pcDNA3.1D/MACC1ΔSH3-V5His* Vektors. Das PXXP-Motiv wurde zu AXXA mutiert.<sup>149</sup> Die verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tabelle 2.2.



**Abb. 2.1: Eukaryotische Expressionsvektoren für MACC1 und die 3 verschiedenen Domänen-Varianten.**

Die vollständige MACC1 cDNA ist 2559 bp lang und kodiert für ein 97 kDa Protein mit PXXP Strukturmotiv, SH3 Domäne und drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Für die funktionelle Analyse der Domänen wurden eine Deletionsvariante ohne SH3-Domäne (MACC1 $\Delta$ SH3), eine Variante ohne PXXP Motiv (MACC1PXXP<sup>mut</sup>) und eine Variante mit Deletion/Mutation beider Motive (MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>) generiert. (Vollständige Bezeichnung der Expressionsvektoren: pcDNA3.1D/MACC1-V5His, pcDNA3.1D/MACC1 $\Delta$ SH3-V5His, pcDNA3.1D/MACC1PXXP<sup>mut</sup>-V5His und pcDNA3.1D/MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>-V5His)

## 2.4 Zellkulturtechniken

### 2.4.1 Zelllinien

Die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien SW480 (ATCC<sup>®</sup>#CCL-228) und SW620 (ATCC<sup>®</sup>#CCL-227) wurden bei der ATCC erworben (LGC Promochem, Wesel)<sup>150</sup>. Die Anzucht der adhärenz wachsenden Zellen erfolgte bei 37 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS (Zellkulturmedien, FKS, Trypsin: PAA Laboratories, Cölbe; Plastikware: TPP, Trasadingen, Schweiz). Die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Kolonkarzinom-Zelllinien Colo 205 (ATCC<sup>®</sup>#CCL-222), HCT 116 (ATCC<sup>®</sup>#CCL-247) und LS 174T (ATCC<sup>®</sup>#CCL-188) und die murine Linie P 388 (ATCC<sup>®</sup>#CCL-46) standen im Labor bereits zur Verfügung und wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

### 2.4.2 Transfektion humaner Zelllinien, Etablierung stabiler MACC1 Klone

Zur Etablierung stabiler Klone wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Ø Schalen angelegt und nach 24 h mittels Lipofectin (Invitrogen) transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte mit 1-2,5 mg/ml Genitcin 418 (Invitrogen). Klone wurden von den Platten isoliert, angezogen und mittels qRT-PCR und Western Blot auf Expression des Transgens charakterisiert.

### 2.4.3 RNA-Interferenz: siRNA Design und Transfektion

Das Design der MACC1 siRNA (small interfering RNA) stammt von C. Daly (Dublin City University, Irland). Die Oligonukleotide wurden durch die Firma Ambion (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert, HPLC-gereinigt und annealed. Bei den verwendeten Met siRNAs handelt es sich um bereits validierte Oligonukleotide (Ambion). Für Kontrollexperimente wurde eine ebenfalls kommerziell erhältliche, geprüfte Kontroll siRNA (Ambion) verwendet. Die Transfektion der siRNA wurde mit Oligofectamine (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.  $2,5 \times 10^5$  Zellen wurden in 6 well Platten eingesät und nach 24 h transfiziert. Die Endkonzentration der siRNAs betrug zwischen 20-50 nM. Bei Verwendung von Cocktails verschiedener siRNAs betrug die Einzel-Konzentration jeweils 20 nM. Der Nachweis der Gen-spezifischen Reduktion der Expression erfolgte 24 h bis 48 h nach Transfektion mittels qRT-PCR bzw. Western Blot. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs findet sich in Tabelle 2.3.

## 2.5 RNA- und Protein-Expressionsanalysen

### 2.5.1 RNA-Präparation aus kultivierten Zellen und Patientengewebe

#### *RNA aus kultivierten Zellen*

Die Gesamt-RNA Isolierung erfolgte mit TRIzol<sup>®</sup> Reagenz (Invitrogen), basierend auf der Methode von Chomczynski.<sup>151</sup> Die nach Herstellerprotokoll isolierte RNA wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Freiburg).

#### *RNA aus Patientengewebe*

Die präparierten Tumorzellareale wurden direkt in TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen. Die Proben wurden mit einem Ultraschall-Homogenisator (SONOPULS HD, Bandelin electronic, Berlin) für 15 Pulse sonifiziert und anschließend wurde die RNA nach Standardprotokoll isoliert. Die RNA Konzentration wurde mit Hilfe des Quant-iT<sup>™</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Assay Kits (Molecular Probes/Invitrogen) bestimmt. Zusätzlich wurden alle aus Patientengewebe isolierten RNA Proben einer Qualitätskontrolle auf dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) unterzogen.

## 2.5.2 Quantitative real-time RT-PCR/qRT-PCR (Two-Step)

### *Reverse Transkription*

Zur cDNA-Synthese wurden 50 oder 100 ng Gesamt-RNA mittels Random Hexamers nach Standardprotokoll revers transkribiert (alle Reagenzien: Applied Biosystems, Darmstadt). PCR Programm: 15 min 42 °C, 5 min 99 °C, 5 min 5 °C, ∞4 °C; (T3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen). 1/10 des Volumens wurde in der qPCR eingesetzt.

### *Quantitative real-time PCR*

Die Expressionsanalyse erfolgte mit dem Hybridization-Probe Detektionsformat auf dem LightCycler® System 2.0 von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Primer wurden von BioTeZ synthetisiert und HPLC gereinigt; die Synthese der FITC- und LCRed640 markierten Sonden erfolgte durch TIB MOLBIOL (Berlin). Tabelle 2.4 enthält alle in dieser Arbeit für die qRT-PCR verwendeten Primer und Sonden.

Für die PCR wurde der LightCycler® DNA Master HybProbe Kit von Roche nach Herstellerprotokoll eingesetzt [PCR-Protokoll: 30sec 95°C, 45x(10sec 95°C, 10sec 60°C, 10sec 72°C), Schmelzkurve 40→95°C].

Zur absoluten Quantifizierung wurden definierte Verdünnungsreihen revers transkribierter RNA aus Zielgen-exprimierenden Zelllinien als Standardkurven verwendet (Kalibrator). Alle Werte wurden auf die parallel analysierte Expression des Housekeeping-Genes G6PDH (LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set, Roche) und die Expression des 50 ng Wertes der Kalibrator-Zelllinie normalisiert. Sämtliche Analysen wurden in Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Die für die jeweilige Zielgen-Expression berechneten Werte ergeben sich wie folgt:

$$\frac{\frac{\text{Mittelwert}_{\text{Zielgen}}}{\text{Mittelwert}_{\text{G6PDH}}}}{\frac{\text{Standardwert } 50 \text{ ng}_{\text{Zielgen}}}{\text{Standardwert } 50 \text{ ng}_{\text{G6PDH}}}} = \text{relative Expression des Zielgens}$$

## 2.5.3 Immunoblotting

MAAC1 wurde als Fusionsprotein mit den Tags V5 und His exprimiert. Der MAAC1-Proteinnachweis erfolgte über einen monoklonalen Maus Anti-V5-IgG<sub>2a</sub> Antikörper (Invitrogen).

### *Zellernte, -Lyse und Gesamtproteinbestimmung*

Die Zellen wurden trypsiniert, die Zellpellets einmal mit PBS gewaschen und in RIPA Puffer lysiert. Die Lysate wurden 20 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Gesamtprotein-Konzentration der Überstände nach Bradford bestimmt (Coomassie Plus, Pierce-Perbio, Bonn).<sup>152</sup>

**SDS-PAGE, Immunoblotting und Detektion**

50 µg Gesamtprotein wurden in der SDS-PAGE eingesetzt [XCell SureLock™ Mini Cell System; NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gele, NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer, 4x SDS-PAGE Ladepuffer (alles Invitrogen); 200 V für ca. 60 min]. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Semidry-Elektroblotting (Trans-Blot® SD Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 20 V für 60 min auf eine Nitrocellulose Membran (Hybond C Extra, Amersham Biosciences-GE Healthcare, München) transferiert. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Antikörper-Inkubation bei 4 °C über Nacht. Alle primären Antikörper wurden in TBST+5 % BSA angesetzt. Die Membran wurde im Folgenden 5x5 min mit TBST gespült und für 1h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörper in TBST inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mittels ECL Western Blotting Detektions-Reagenz (Amersham) und CL-XPosure™ Film (Pierce-Perbio) das Proteinsignal detektiert. Die Expositionszeiten variierten je nach Signalstärke zwischen 30 sec und 30 min. Erfolgte der Nachweis zweier verschiedener Proteine auf einer Membran, so wurde die Membran nach Nachweis des ersten Proteins 20 min bei 50 °C gestrippt, 3x5 min TBST gewaschen, erneut blockiert und danach mit dem weiteren primären Antikörper inkubiert. Die Tabellen 2.6 und 2.7 enthalten die in dieser Arbeit für Western Blots verwendeten primären und sekundären Antikörper.

RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 pro 10 ml Lysepuffer 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim)
TBST	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,5 200 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol
Blockpuffer	TBST + 5 % Magermilchpulver +1 % BSA
Stripping Puffer	62,5 mM Tris•Cl (pH 6,7) 2 % SDS 100 mM 2-Mercaptoethanol

## 2.6 Funktionelle *in vitro* Assays

### 2.6.1 Migrationsassay

Alle Migrationsassays wurden nach Standardprotokoll durchgeführt.<sup>153,154</sup> Es wurden 12 well Zellkulturplatten mit Einsätzen von 12 µm Porengröße verwendet (Corning Costar®/Fisher Scientific GmbH, Schwerte).  $2,5 \times 10^5$  Zellen wurden in die über Nacht äquilibrierte Kammer eingesät. Nach 24 h wurde der Einsatz entfernt, das Medium abgesaugt, die Zellen trypsinisiert und die Zahl der durch den Filtereinsatz migrierten Zellen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die siRNA behandelten Ansätze wurden 24 h vor Einsaat in die Transwells in 6 well Platten nach Standardprotokoll transfiziert. Alle Messungen wurden als Vierfach-Bestimmung durchgeführt.

### 2.6.2 Invasionsassay

Über Nacht äquilibrierte 12 well Transwell-Kammern wurden 4 h vor Einsaat der Zellen mit 200 µl Matrigel nach Herstellerprotokoll überschichtet (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)<sup>155-157</sup>. Pro Kammer wurden  $5 \times 10^5$  Zellen eingesät. Alle siRNA-Ansätze wurden analog zum Migrationsassay 24 h vor Einsaat in die Transwells transfiziert. 72 h nach Einsaat wurden die durch das Matrigel invadierten Zellen aus der unteren Kammer geerntet und die Zellzahl bestimmt. Die Messungen erfolgten als Vierfach-Bestimmung.

### 2.6.3 Scatterassay

Pro well wurden 2000 Zellen in 96 well Platten angelegt. SiRNA behandelte Ansätze wurden einen Tag vor der Einsaat transfiziert. Nach 24 h wurden 20 Units/ml HGF zugegeben. Die Morphologie der Zellen wurde 24-48 h nach HGF Zugabe dokumentiert (Vergrößerung: 125fach; Mikroskop: Leitz DM IL, Leica, Wetzlar).

Folgende Inhibitoren kamen im Scatterassay zum Einsatz:

#### PI3K-Inhibitoren

LY294002	Konzentration: 50 µM
Wortmannin	Konzentration: 5 µM

#### MEK1/2 Inhibitoren

UO126	Konzentration: 20 µM
PD98059	Konzentration: 50 µM

LY294002, UO126 und PD98059 wurden bei Cell Signaling Technology/ New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) erworben, Wortmannin bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München). Alle Inhibitoren wurden nach Herstellerprotokoll in DMSO aufgenommen und in den angegebenen Endkonzentrationen 2 h vor HGF-Induktion zu den Zellen gegeben. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit einem identischen Volumen DMSO behandelt wurden.



### 2.6.4 Wundheilungsassay (gerichtete Migration)

$2,5 \times 10^5$  Zellen wurden in 6 well Zellkulturplatten (TPP) eingesät. Bei 80-90 % Konfluenz (nach 24-48 h) wurde mit einer Pipettenspitze eine definierte Wunde in den Zellrasen gesetzt und alle 24 h die Migration der Zellen in den zellfreien Bereich dokumentiert (Vergrößerung: 125fach; Mikroskop: Leitz DM IL, Leica, Wetzlar).<sup>158,159</sup> Bei Ansätzen zur siRNA Analyse wurden die Zellen 24 h vor Einsaat nach Standardprotokoll mit der entsprechenden siRNA transfiziert.

### 2.6.5 Koloniebildung im Softagar

$5 \times 10^4$  Zellen wurden in 0,4 % Softagar angelegt. Hierzu wurden die Zellen in 2,5 ml vorbereitetem 2x Medium aufgenommen und 1:1 in steriler, vorgewärmter 0,8 % Agarose verdünnt. Die Suspension wurde in 6 cm Ø Raster-markierte Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden) gegeben und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. SiRNA Ansätze wurden 24 h vor Einsaat in den Softagar transfiziert. Nach ca. 14 Tagen erfolgte die Auszählung der Kolonien am Mikroskop. Für jeden Ansatz wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

0,4 % Softagar	20 ml 10x DMEM ohne Phenolrot 2 ml 100x Penicillin/Streptomycin 2 ml 100x L-Glutamin 2 ml 100x Pyruvat 20 ml FKS ad 100ml mit sterilem ddH <sub>2</sub> O
	1:1 mit 0,8 % steriler Agarose in ddH <sub>2</sub> O mischen

### 2.6.6 Proliferationsassay

4000 Zellen/well wurden im 48 well Format angelegt (TPP). Bei Bedarf erfolgte 24 h zuvor die siRNA-Transfektion nach Standardprotokoll. Am nächsten Tag wurde das Serum-supplementierte Medium durch serumfreies Medium ersetzt und 20 U/ml HGF zugegeben. Über die nächsten 4 Tage wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl/well bestimmt (Vierfach-Bestimmung).

## 2.7 Analyse der subzellulären Lokalisation

### 2.7.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

$5 \times 10^4$  Zellen je Kammer wurden in 8 well Chamberslides (Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Nunc, Wiesbaden) angelegt und 24 h inkubiert. Die HGF Induktion erfolgte für 2 h bei einer Konzentration von 20 Units/ml. Anschließend wurden die Zellen mit frisch angesetztem 3 % Paraformaldehyd/PBS (Sigma-Aldrich) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, 3x5 min PBS gewaschen und permeabilisiert (10 min in 0,5 % Triton X100, 1 % BSA/PBS). Nach 3x5 min Waschen mit PBS und einer 30 minütigen

Blockierung (5 % BSA/PBS) folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Alle Immunfluoreszenz-Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem monoklonalen Maus Anti-V5-IgG<sub>2a</sub> Antikörper (1:200 Verdünnung in 1 % BSA/PBS) durchgeführt. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die Kammern 3x5 min mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Detektion mit einem FITC-gekoppelten Ziege F(ab')<sub>2</sub> Anti-Maus IgG sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:200 in 1 % BSA/PBS, Inkubationszeit 1h bei Raumtemperatur; BioSource International, Camarillo CA, USA). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Objektträger nach wiederholtem Waschen für 20 min mit DAPI (1 µg/ml in PBS; Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger nochmals mit PBS gewaschen, mit Deckgläschen und Fluorescence-Mounting-Medium (Dako Cytomation GmbH, Hamburg) versiegelt und im Dunkeln aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte an einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Vergrößerung: 630fach; Software: AxioVision 4.2; Carl Zeiss AG, Göttingen).

### **2.7.2 Präparation der Kernextrakte und cytoplasmatischer Fraktionen**

Die Präparation erfolgte mit Hilfe der NE-PER<sup>®</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce-Perbio) nach Protokoll des Herstellers. Die Puffer CER I und NER wurden mit Protease-Inhibitoren (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, Roche Applied Science) versetzt. Pro Ansatz wurde eine konfluente 10 cm Ø Schale Zellen eingesetzt. Die Extrakte wurden bis zur Analyse im Western Blot bei -80 °C gelagert.

## **2.8 Promotoranalysen**

### **2.8.1 CAT-Reportergenstudien**

Die Met-Promotor tragenden Reportergen-Plasmide wurden von Y. Liu (University of Pittsburgh, PA, USA) zur Verfügung gestellt.<sup>145</sup> Tabelle 2.1 enthält alle für die Promotoranalysen eingesetzten Plasmide. Für die Reporterassays wurde der CAT-ELISA Kit von Roche Applied Science entsprechend des Herstellerprotokolls eingesetzt. 2,5x10<sup>5</sup> Zellen wurden je well in 6 well Platten angelegt und mit den entsprechenden Reportergen-tragenden Plasmiden transfiziert. Bei Einsatz von siRNAs wurden die Zellen 24 h vor Transfektion mit dem Reporterkonstrukt mit der siRNA transfiziert.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im ELISA die CAT-Proteinexpression quantifiziert. Die gemessene CAT-Expression wurde normalisiert auf den Gesamtproteingehalt der Lysate und die Transfektionseffizienz in den unterschiedlichen Zelllinien. Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgte über die parallele Transfektion eines CAT-Expressionsvektors unter Regulation des SV40 Promotors [pCAT3-Control (Promega)].

## 2.8.2 Chromatin-Immunpräzipitation

### ***Zellernte und Lyse***

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde auf der Basis der Methode von Spencer et al. durchgeführt<sup>160</sup>. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 cm Ø Zellkulturschalen angelegt. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen mit 1 % Formaldehyd/PBS, pH 7,5 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und in 750 µl Lysis Puffer A resuspendiert.

### ***DNA Fragmentierung***

Die Lysate wurden auf Eis für 20 Pulse bei 40-50 % output mit dem Ultraschall-Homogenisator sonifiziert. Zur Bestimmung der idealen Sonifizierungs-Bedingungen wurden in einem Vorversuch nach Spencer et al. die entstehenden DNA-Fragmentgrößen mittels Gelelektrophorese analysiert.

Nach der DNA-Fragmentierung wurden die Lysate für 10 min bei 10000 rpm (4 °C) zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Überstände mit ChIP-RIPA Puffer auf eine Absorption von 2  $A_{260}$  units/ml eingestellt. 200 µl des verdünnten Lysats wurden abgenommen und später als Input in der ChIP-Analyse eingesetzt.

### ***Vorbereitung der Agarose-Beads, Preclearing***

Die Protein G Agarose wurde 2x mit PBS gewaschen (Recombinant Protein G Agarose, Invitrogen). Anschließend wurde das Originalvolumen wiederhergestellt und die Matrix mit 0,1 mg/ml sonifizierter Lachssperma DNA (Sigma-Aldrich) präabsorbiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Zum Preclearing der Lysate wurden 30 µl 50:50 (v/v) Agarose zu den Zelllysaten gegeben, 30 min inkubiert, abzentrifugiert und die Lysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### ***Immunpräzipitation und Elution der DNA-Protein Komplexe***

Zu den Lysaten wurden 5 µg des primären Antikörpers gegeben, die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Überkopf-Schüttler.

Für die Chromatin-Immunpräzipitationen wurde der Maus Anti- V5 IgG<sub>2a</sub> Antikörper von Invitrogen genutzt. Neben den zu analysierenden Proben wurden IgG Isotypen Kontrollen (Becton Dickinson GmbH) mitgeführt. Anschließend wurden 50 µl 50:50 (v/v) Protein G Agarose je Probe zugegeben und nochmals für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde 3x mit ChIP-RIPA, 3x mit ChIP-RIPA + 1 M NaCl und 2x mit TE gewaschen (jeweils 4 min). Abschließend wurden die immunpräzipitierten DNA-Protein Komplexe von den Agarosebeads eluiert. Hierfür wurden die Agarosebeads 15 min in 200 µl 1,5 % SDS Elutionspuffer inkubiert, abzentrifugiert und die eluierten Komplexe in ein neues Tube überführt. Die Elution wurde mit 150 µl 0,5 % SDS wiederholt und die zwei eluierten Volumina vereinigt.

**DNA-Isolierung**

Die eluierten DNA-Protein Komplexe, ebenso wie die als Input abgenommenen Proben, wurden zur Revertierung der Crosslinkings für 6 h bei 68 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 2 h bei 55 °C der Proteinverdau durch Proteinase K (50 µg/ml Proteinase K in 200 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 40 mM Tris-HCl pH 6,5). Die Proben wurden dann mit einem Gemisch von 25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert und mit 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Die Pellets wurden mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

**PCR-Analyse der isolierten DNA-Fragmente**

Die PCR zur Analyse der isolierten DNA-Fragmente wurde auf dem LightCycler 2.0 System nach den unter 2.5.2 beschriebenen PCR Protokollen durchgeführt. Es wurden jedoch keine Hybridisierungs-Sonden eingesetzt. Die abschließende Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese der amplifizierten PCR-Produkte (1,8 % Agarosegele bei 70 V). Die für die PCR verwendeten Primer finden sich in Tabelle 2.5.

Lysis Puffer A	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 8,0
ChIP-RIPA Puffer	0,1 % SDS 0,1 % Natriumdeoxycholat 1 % Triton X-100 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 140 mM NaCl  10 mM Tris-HCl pH 8,0
ChIP-RIPA Puffer	wie ChIP-RIPA Puffer bis auf 1M NaCl +1 M NaCl
TE Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0
1,5 % SDS Elutionspuffer	1,5 g SDS in 100 ml ddH <sub>2</sub> O
0,5 % SDS Elutionspuffer	1 g SDS in 100 ml ddH <sub>2</sub> O

## 2.9 *In vivo* Metastasierung

### 2.9.1 Tiermodelle

Alle *in vivo* Experimente wurden mit der AG Experimentelle Pharmakologie und Onkologie am MDC (Frau Dr. I. Fichtner) durchgeführt.

Zur Evaluierung des *in vivo* Metastasierungspotentials wurden  $1 \times 10^6$  bzw.  $3 \times 10^6$  stabil MACC1-, MACC1 $\Delta$ SH3- oder Kontrollvektor-transfizierte Zellen der Kolonkarzinomlinien SW480 oder LS 174T in die Milz der Mäuse inokuliert. Es wurden 6-8 Wochen alte, männliche NMRI nu/nu Mäuse (SW480 Modell) und NOD/SCID Mäuse (LS 174T Modell) eingesetzt. Jede Versuchsgruppe enthielt 6 Tiere. Die Tiere wurden 60 Tage (SW480 Modell), bzw. 34 Tage (LS 174T Modell) nach Transplantation abgetötet und die Metastasierung in die Leber evaluiert. Milz und Leber wurden entnommen, schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### 2.9.2 Molekularer Nachweis humaner Zellen in murinen Lebergeweben

Der Nachweis humaner Zellen/DNA erfolgte nach einer von Becker et. al. publizierten Methode.<sup>161</sup> Hierbei wird mittels PCR humane Satelliten DNA in xenotransplantierten Geweben nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht auch den Nachweis makroskopisch nicht sichtbarer Mikrometastasen.

Zunächst wurden am Kryomicrotom von den murinen Lebergeweben Schnittserien von 10 Schnitten á 10 µm Schichtdicke angefertigt. Aus diesen Schnittserien wurde mit Hilfe des Kits Invisorb Spin Tissue Mini Kits (InViTeK GmbH) die genomische DNA isoliert.

Um die Zahl der detektierten humanen Zellen im Mausgewebe zusätzlich quantifizieren zu können wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Eichkurve etabliert. Hierzu wurden  $1; 10; 100; 10^3; 10^4; 10^5$  und  $10^6$  Zellen der humanen Kolonkarzinomlinie HCT 116 in  $1 \times 10^7$  murine P 388 Zellen titriert und aus dem Zellgemisch analog den Gewebeschnitten DNA isoliert.

125 ng der isolierten DNA aus den Schnittserien und der Verdünnungsreihe wurden in der real-time PCR eingesetzt und somit die Zahl der humanen Zellen in den Mauslebern quantifiziert. Die spezifischen Primer und Hybridisierungs sonden für den Nachweis humaner Satelliten DNA finden sich in Tabelle 2.4. Zusätzlich zu der humanen Satelliten DNA wurde auch humane MACC1 DNA nachgewiesen. Dazu wurden die bereits für die Expressionsanalyse verwendeten Primer und Sonden eingesetzt. Die PCR Produkte wurden abschließend in einer Gelelektrophorese visualisiert.

## 2.10 Analyse klinischer Tumorproben

### 2.10.1 Patientengewebe

Die MACC1-Expressionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik (I. Wendler, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Buch) durchgeführt. Von allen Patienten liegt eine schriftliche

Einverständniserklärung zur Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke vor (genehmigt durch die Ethikkommission der Charité).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15 Proben normaler Mucosa, 13 Adenome und 60 Karzinome untersucht. Das mediane Alter der 39 weiblichen und 48 männlichen Patienten lag bei 64 Jahren. Die Klassifizierung der Tumoren erfolgte entsprechend der UICC und WHO Richtlinien. Die 60 Kolonkarzinompatienten wurden folgendermaßen klassifiziert: 17 Patienten UICC I (T1-2N0M0), 23 Patienten UICC II (T3-4N0M0) und 20 Patienten UICC III (T1-4N1M0). Es wurde ausschließlich Primärtumormaterial von Patienten ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Resektion keine Metastasierung zeigten (UICC Stadien I-III). Alle Patienten waren weder chemo-, noch radiotherapeutisch vorbehandelt. Patienten mit einem hereditär bedingten Tumor wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Als weiteres Ausschlusskriterium galt das Auftreten eines zweiten Tumors der gleichen oder auch einer anderen Entität. Alle Proben wurden durch Mitarbeiter der Tumorbank geblindet, so dass zum Zeitpunkt der Analyse keine Information über das Tumorstadium oder den Metastasierungsstatus des Patienten zugänglich war. Die Nachbeobachtungszeit betrug mindestens 5 Jahre. Währenddessen wurden die Patientendaten beständig aktualisiert. Eine Liste des in der Untersuchung eingesetzten Patientenmaterials findet sich im Anhang.

### **2.10.2 Aufarbeitung der Gewebeproben**

Alle Gewebeproben wurden sofort nach der Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch die Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik bei -80°C archiviert. Das gefrorene Gewebe wurde mit Tissue-Tek® Medium (Sakura Finetek, Heppenheim) montiert. Mit einem Kryomicrotom (CM1900, Leica, Wetzlar) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Von jeder Gewebeprobe wurden Schnittserien à 15 Objektträger angelegt und bei -80°C gelagert. Der erste und letzte Schnitt jeder Serie wurden Hämatoxylin/Eosin gefärbt und durch einen Pathologen begutachtet (Dr. W. Haensch, Charité) (Abb. 2.1). Anschließend wurden mit einer Kanüle die vom Pathologen gekennzeichneten Tumoreale von den seriellen, gefrorenen Kryoschnitten isoliert und direkt in TRIzol® aufgenommen. Die MACC1-Expressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR wie unter 2.5 angegeben.

### **2.10.3 Statistische Auswertung der Patientendaten**

Alle statistischen Auswertungen und Berechnungen der Patientendaten betreffend wurden von der Studienzentrale der Robert-Rössle Klinik (M. Niederstrasser) vorgenommen.

Die Signifikanzberechnung für die Box-Plots erfolgte mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests und der Varianzanalyse (ANOVA). Die Berechnung des Grenzwertes (cut-off) der MACC1 Expression zur Unterscheidung hoch und niedrig MACC1 exprimierender Patienten wurde durch ROC Analyse ermittelt.<sup>162</sup> Für den cut-off der Met-Expression wurde der mediane Met-Expressionswert der analysierten Tumoren ausgewählt.

Zur Evaluierung des prognostischen Wertes der MACC1 und der Met Expression im Primärtumor wurden Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier Methode) durchgeführt. Die Signifikanzberechnungen für die Überlebenszeitanalysen erfolgten mit Hilfe des Log-Rang-Tests.

Die Validierung der Unabhängigkeit MACC1s als prognostischer Marker vom Alter und Geschlecht des Patienten, von der Tumor Infiltration, dem Nodalstatus und der Invasion in die Lymphgefäße erfolgte mittels Logistischer- und Cox-Regression.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 MACC1-Expression in Tumorzellen

Zur Untersuchung der molekularen Funktion von MACC1 im Kolonkarzinom wurde zunächst ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert. Hierzu wurde in einer Reihe humaner Kolonkarzinom-Zelllinien mittels qRT-PCR die MACC1-Expression bestimmt. Die untersuchten Zelllinien zeigten sehr unterschiedliche MACC1-Expressionsniveaus.

Zur Generierung stabiler MACC1-Transfektanten wurde die aus einem humanen, primären Adenokarzinom generierte Zelllinie SW480 ausgewählt. SW480 Zellen weisen ein sehr niedriges, endogenes MACC1-Niveau auf. Die Zelllinie eignet sich deshalb gut für die Analyse der durch MACC1-Überexpression bedingten biologischen Effekte.

Die *in silico* Analyse der identifizierten MACC1-cDNA zeigte eine PXXP-Domäne, eine SH3-Domäne und 3 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Um die Bedeutung dieser 3 Motive für die Funktionalität des Proteins zu analysieren wurden drei MACC1-Domänenvarianten generiert (Abb. 3.1A). In der MACC1 $\Delta$ SH3 Expressionskassette wurde die SH3-Domäne deletiert, MACC1PXXP<sup>mut</sup> trägt eine mutierte, funktionslose PXXP-Domäne und in der Variante MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> wurden beide Motive deletiert bzw. mutiert.

Sowohl der vollständige MACC1-Expressionsvektor, als auch die drei MACC1-Konstrukte mit alterierter Domänenstruktur wurden stabil in SW480 Zellen transfiziert. Die stabilen SW480/MACC1 Klone wurden mittels qRT-PCR und Western-Blot charakterisiert. Abbildung 3.1.B zeigt je einen repräsentativen Klon für jede MACC1-Expressionsvariante. Alle ausgewählten Klone zeigen eine etwa 100fache Überexpression des Transgens.

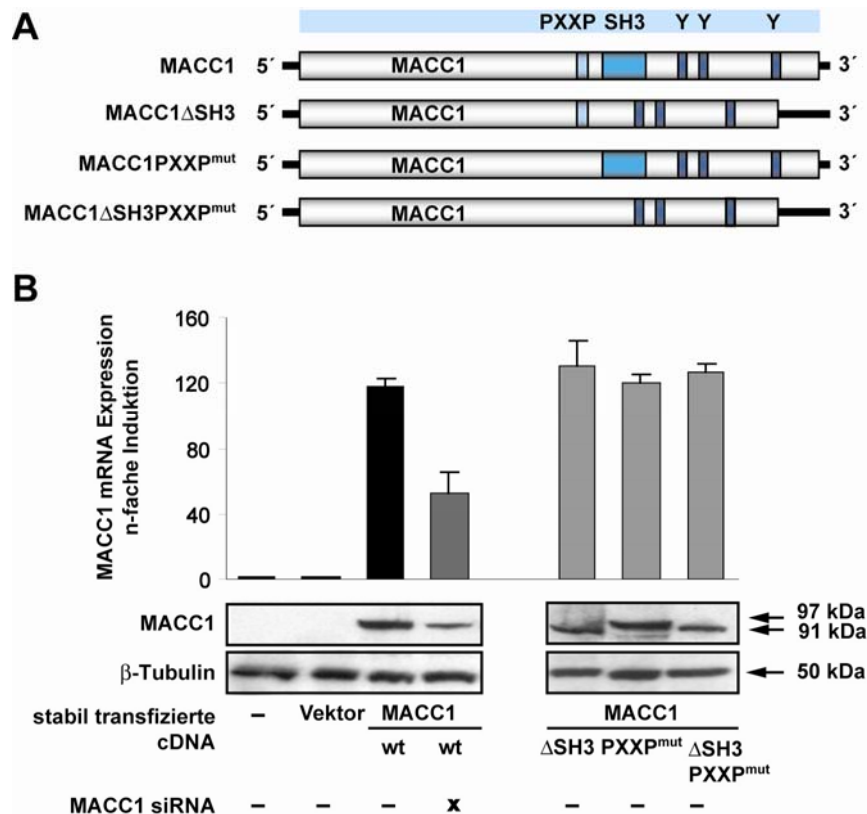
Als Vektorkontrolle wurden stabile Klone des Kontroll-Plasmids pcDNA3.1D/lacZV5-His etabliert. Diese Transfektanten zeigten keine erhöhte MACC1-Expression (Abb. 3.1B).

Parallel wurde die Applikation MACC1-spezifischer siRNA etabliert. Diese Technik ermöglicht eine gezielte, genspezifische Expressions-Reduktion.<sup>163,164</sup>

Der MACC1-spezifische Expressions knock-down um 60% wurde sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 3.1B). Kontrollexperimente mit Sequenz-unspezifischer Kontroll-siRNA zeigten keinen Effekt auf die MACC1 Expression.

Jeweils 2 Klone der vollständigen MACC1 cDNA und der drei verschiedenen Deletionsvarianten mit vergleichbarem Expressionsniveau wurden in den folgenden *in vitro* Experimenten eingesetzt. Zum Nachweis der Genspezifität der biologischen Effekte wurden parallel siRNA Ansätze mitgeführt.





**Abb. 3.1: Charakterisierung der stabilen SW480/MACC1 Klone und der entsprechenden Deletionsvarianten.**

(A) MACC1-Domänenstruktur und generierte Mutanten. MACC1 trägt ein PXXP-Strukturmotiv, eine SH3-Domäne und drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Für die funktionelle Analyse der Domänen wurden eine Deletionsvariante ohne SH3-Domäne (MACC1 $\Delta$ SH3), eine Variante ohne PXXP-Motiv (MACC1PXXP<sup>mut</sup>) und eine Variante mit Deletion/Mutation beider Motive (MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>) generiert.

(B) MACC1-Expression in der parentalen Zelllinie SW480, der stabilen Kontroll-Vektor-Transfektante und je einem repräsentativen Klon jeder MACC1-Domänenvariante. Die mittels qRT-PCR analysierte MACC1-mRNA-Expression wurde normalisiert auf die Expression des Housekeeping-Genes G6PDH und ist angegeben als n-fache Induktion im Vergleich zur parentalen Linie SW480. Der Proteinnachweis im Western-Blot erfolgte mittels eines V5-spezifischen Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das cytoskeletale Protein  $\beta$ -Tubulin eingesetzt. Die Applikation von MACC1-spezifischer siRNA führte zu einer deutlichen Reduktion der MACC1 Expression. Im Western Blot der Deletionsvarianten wird der durch die Deletion der SH3-Domäne bedingte Größenunterschied von 6 kDa deutlich.

### 3.2 MACC1 induziert Migration, Invasion und Proliferation in Tumorzellen

Metastasierende Tumorzellen sind gekennzeichnet durch eine stark erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit. Außerdem zeigen viele Tumorzellen die Fähigkeit adhäsionsfrei zu proliferieren (das sogenannte anchorage independent growth). Um den Einfluß der MACC1 Expression auf diese

Charakteristika hin zu untersuchen wurden deshalb die stabilen Transfektanten zunächst in Migrations-, Invasions- und Proliferationsassays analysiert.<sup>165</sup>

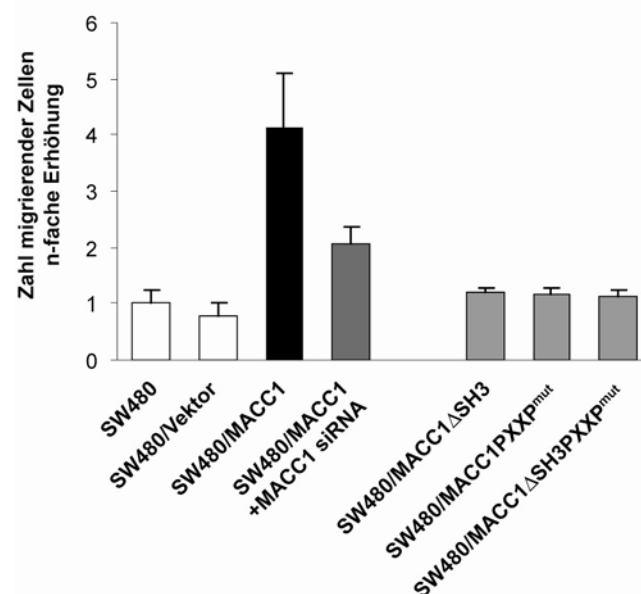
### 3.2.1 MACC1 reguliert das migratorische Verhalten von Tumorzellen

#### Migration

Der „Boyden Chamber“ Migrationsassay wird eingesetzt, um das migratorische Verhalten von z.B. Tumorzellen zu analysieren.<sup>154</sup> Definierte Zellzahlen der stabilen MACC1 Klone wurde in die Kammern eingesät und nach 24 Stunden die Zahl der durch den Porenfilter migrierten Zellen bestimmt (Abb. 3.2). Parallel wurden MACC1-siRNA transfizierte Zellen geprüft, um die Genspezifität des biologischen Effekts zu validieren.

MACC1-überexprimierende Zellen zeigten eine deutliche Induktion des migratorischen Verhaltens im Vergleich zu den Kontrollen. Die Zahl der migrierenden Zellen war um das Vierfache erhöht. Diese Induktion konnte durch MACC1-siRNA deutlich reduziert werden.

Die stabilen Klone der MACC1-Domänenmutanten zeigten dagegen ähnliche Zahlen migrierender Zellen wie die parentale Linie SW480. Die Deletion einer der beiden funktionellen Domänen führte zum Funktionsverlust des MACC1 Proteins in diesem biologischen Assay.



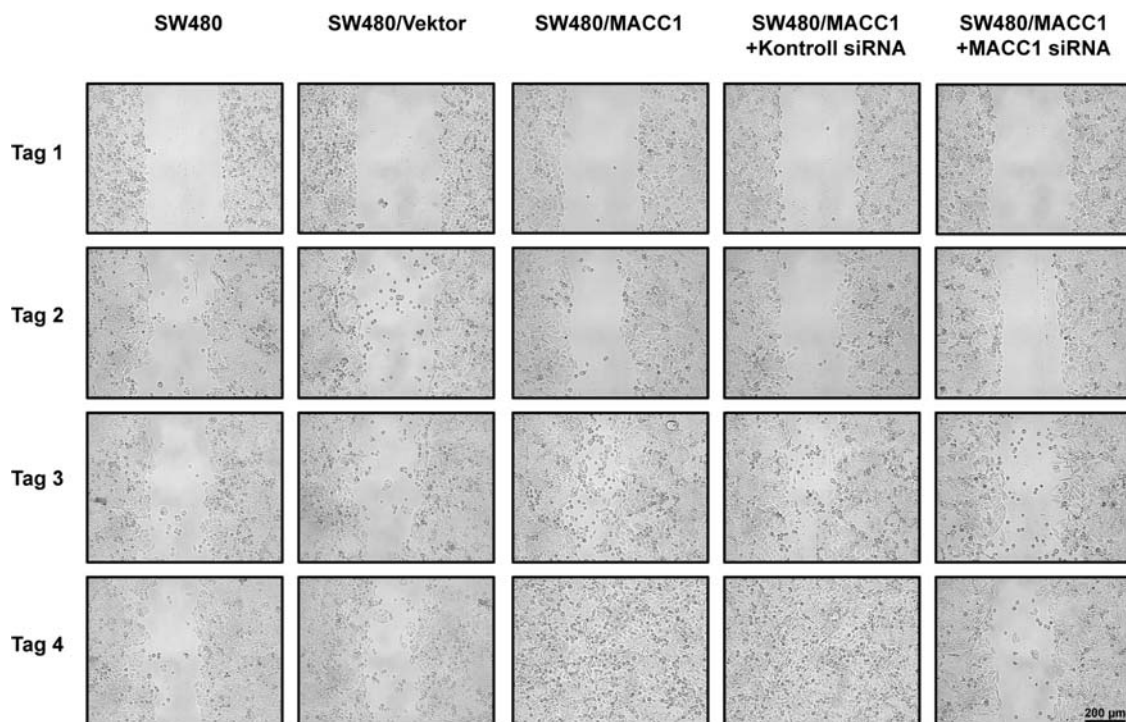
**Abb. 3.2: MACC1 aktiviert die Migration von Tumorzellen.**

„Boyden Chamber“ Migrationsassay der MACC1-Transfektanten. MACC1-Transfektanten zeigten eine vierfach erhöhte Migrationsrate im Vergleich zu den Kontrollen und den Transfektanten der Domänenmutanten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>. Die Induktion konnte durch Transfektion MACC1-spezifischer siRNA revertiert werden. In der Graphik ist die Zahl der migrierenden Zellen als n-faches der für die parentale Zelllinie ermittelten Zellzahl angegeben.

### Wundheilung

Zur Analyse der gerichteten Migration der MACC1-transfizierten Zellen wurde der Wundheilungsassay herangezogen.<sup>158</sup> Hierbei wird dem konfluenten Zellrasen mit einer Pipettenspitze eine definierte Verletzung zugefügt und im Folgenden die Migration der angrenzenden Zellen in diesen Wundbereich alle 24 Stunden mikroskopisch dokumentiert.

Während die parentale Linie und die Vektor-Transfektante nur geringfügige Migration in den Wundbereich zeigten, war der Zellrasen in den MACC1-Transfektanten nach 4 Tagen bereits vollständig geschlossen (Abb. 3.3). Demnach zeigen MACC1 überexprimierende Zellen eine stark erhöhte gerichtete Migration. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt MACC1-spezifisch ist, da in den MACC1-siRNA-Transfektanten eine deutliche Retardierung dieses migratorischen Effektes zu beobachten war. Die Transfektion von Kontroll-siRNA hatte dagegen keinen Einfluß auf das migratorische Verhalten der MACC1-Zellen.

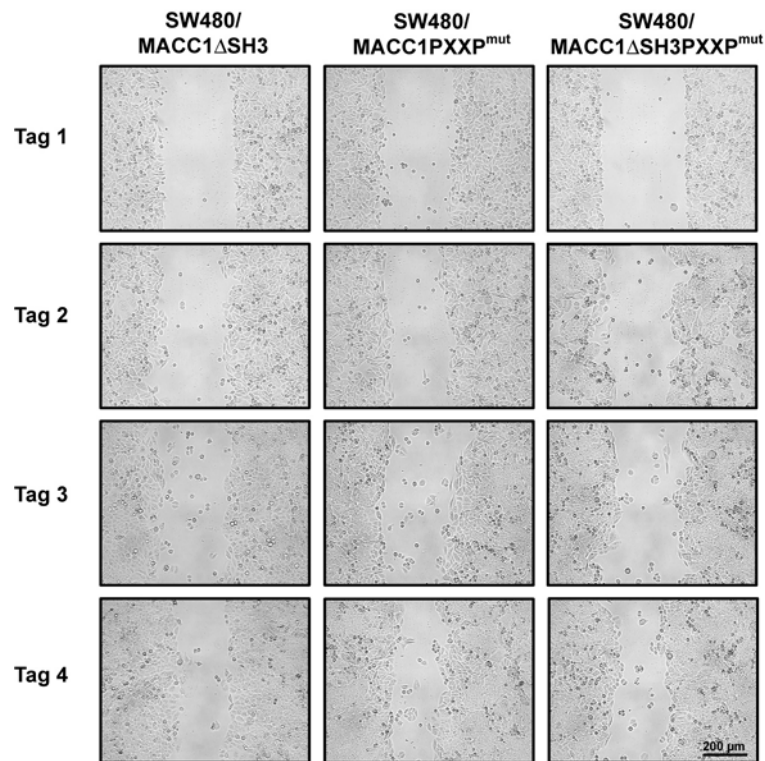


**Abb. 3.3: MACC1 induziert die gerichtete Migration in Tumorzellen.**

Wundheilungsassay mit der parentalen Linie, der stabilen Kontroll- und MACC1-Transfektante. Dem konfluenten Zellrasen wurde mittels Pipettenspitze eine definierte Wunde zugefügt und an den folgenden Tagen die Migration der Zellen in diesen Bereich dokumentiert. MACC1 Transfektanten wiesen bereits nach 4 Tagen einen vollständig geschlossenen Zellrasen auf. Während transfizierte Kontroll-siRNA keinen Effekt zeigte, führte die Transfektion MACC1 spezifischer siRNA zu einer deutlichen Verlangsamung der gerichteten Migration in MACC1-Transfektanten.

Parallel wurden die MACC1-Domänenvarianten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> im Wundheilungsassay eingesetzt, um die Bedeutung der MACC1-Domänenstruktur für die gerichtete Migration zu

untersuchen (Abb. 3.4). Alle drei MACC1-Mutanten zeigten einen migratorischen Phänotyp ähnlich dem der parentalen Zelllinie SW480. Nach vier Tagen war der Wundbereich noch gut sichtbar und nur wenige Zellen waren in die zellfreie Zone migriert. Sowohl die SH3-Domäne, als auch die PXXP-Domäne haben somit essentielle Bedeutung für die Induktion der MACC1-vermittelten Migration.



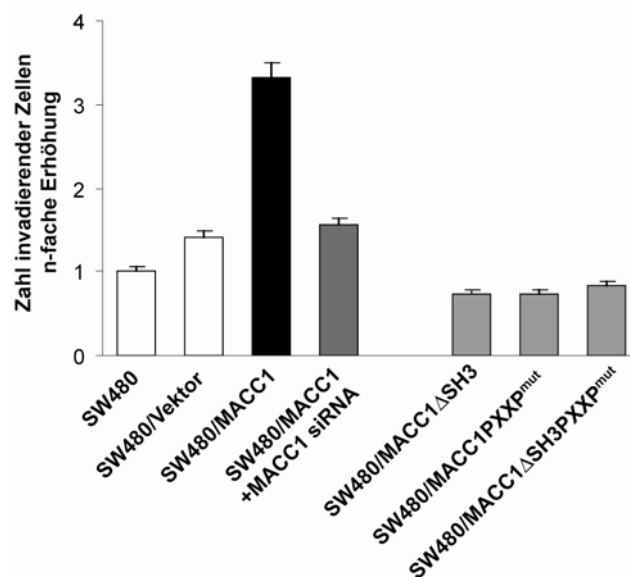
**Abb. 3.4: Die MACC1-Domänen SH3 und PXXP sind essentiell für die MACC1-vermittelte Induktion der gerichteten Migration.**

Wundheilungsassay in den stabilen Klonen der MACC1-Deletionsvarianten MACC1ΔSH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1ΔSH3PXXP<sup>mut</sup>. Alle drei Domänenvarianten zeigten ein Migrationsverhalten wie die parentale Zelllinie (Abb. 3.3): Nur wenige Zellen migrierten in den Wundbereich, so dass am Tag 4 die Verletzung im Zellrasen noch deutlich sichtbar war.

### 3.2.2 MACC1 induziert das invasive Wachstum

Die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe ist einer der zentralen Prozesse bei der Entwicklung distanter Metastasen. Das metastatische Potential von Tumorzellen wird wesentlich durch deren invasive Eigenschaften determiniert.<sup>34,43,51</sup> Aus diesem Grund wurde der Einfluß der MACC1-Überexpression auf die Invasivität der transfizierten Tumorzellen in einem „Boyden Chamber“ Invasionsassay analysiert. Hierzu wurden die schon in der Migrations-Analyse verwendeten Transwell-Kammern zur Simulation einer extrazellulären Matrix mit Matrigel beschichtet, die Zellen in die Kammern eingesät und die Zahl der durch den beschichteten Filter invadierten Zellen

bestimmt.<sup>166</sup> Die MACC1-Transfektanten zeigten eine um mehr als das dreifach höhere Zahl durch das Matrigel invadierender Zellen im Vergleich zur parentalen Linie (Abb 3.5). Dieser Effekt konnte durch MACC1-siRNA Applikation fast vollständig revertiert werden. Die gezeigte Induktion ist also MACC1-genspezifisch. In den drei MACC1-Domänenmutanten wurden dagegen nur geringe Invasionsraten auf Niveau der untransfizierten Zellen nachgewiesen. Dementsprechend sind sowohl die SH3- als auch die PXXP-Domäne von essentieller Bedeutung für die Funktion von MACC1 als Induktor der Invasivität.



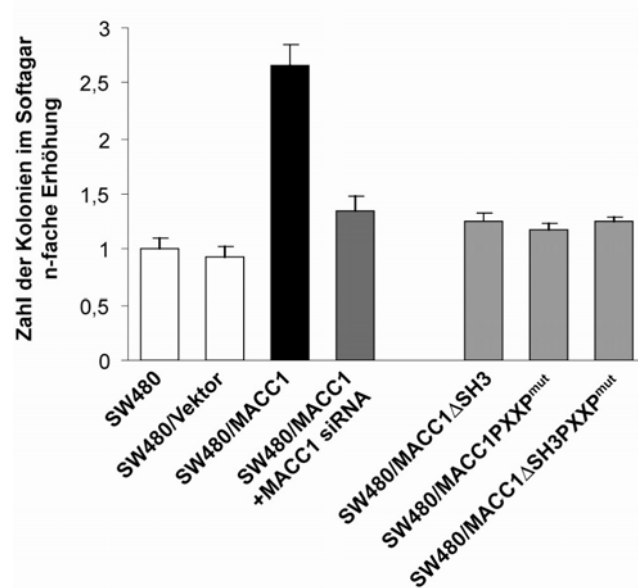
**Abb. 3.5: MACC1 reguliert die Invasivität von Tumorzellen.**

„Boyden Chamber“ Invasionsassay der MACC1-überexprimierenden Zellen und der entsprechenden Deletionsvarianten. Stabile MACC1-Klone zeigten im Vergleich zur parentalen Zelllinie eine 3,5fach erhöhte Rate invadierender Zellen. Diese Induktion wurde durch MACC1-siRNA revertiert. Die MACC1-Deletionsvarianten wiesen keine erhöhten Zahlen invadierender Zellen auf. Die Graphik zeigt die Zahl der migrierenden Zellen als n-faches der ermittelten Zellzahl in der parentalen Linie SW480.

### 3.2.3 MACC1 aktiviert die adhäsions-unabhängige Proliferation

Viele Tumorzellen zeigen die Fähigkeit unabhängig von der Adhäsion an einen Zellverband zu proliferieren (das sogenannte anchorage independent growth).<sup>167</sup> Dieses adhäsionsfreie Wachstum spielt eine zentrale Rolle im Metastasierungsprozess.<sup>127,168</sup>

Um den Einfluss der MACC1-Expression auf die adhäsionsfreie Proliferation von Tumorzellen zu untersuchen, wurden die stabil exprimierenden SW480/MACC1 Zellklone im Softagar-Koloniebildungsassay untersucht. Hierzu wurden definierte Zellzahlen der parentalen Zelllinie und der stabilen Transfektanten in Softagar angelegt und nach 14 Tagen die Zahl der gebildeten Kolonien ermittelt.



**Abb. 3.6: MACC1 induziert das adhäsions-unabhängige Wachstum von Tumorzellen..**

Zur Analyse des adhäsionsfreien Wachstums wurden definierte Zellzahlen der verschiedenen stabilen SW480/MACC1 Klone in Softagar angelegt und nach 14 Tagen die Anzahl der gebildeten Kolonien ausgezählt. MACC1 Klone zeigten eine fast dreifache Erhöhung der Koloniezahl im Vergleich zur parentalen Linie. Dieser Effekt konnte durch Transfektion MACC1 spezifischer siRNA revertiert werden. MACC1-Deletionsvarianten zeigten sämtlich Kolonienzahlen im Bereich der Wildtyp-Zelllinie. Die Kolonienzahlen wurden angegeben als n-faches des in der parentalen Linie bestimmten Wertes.

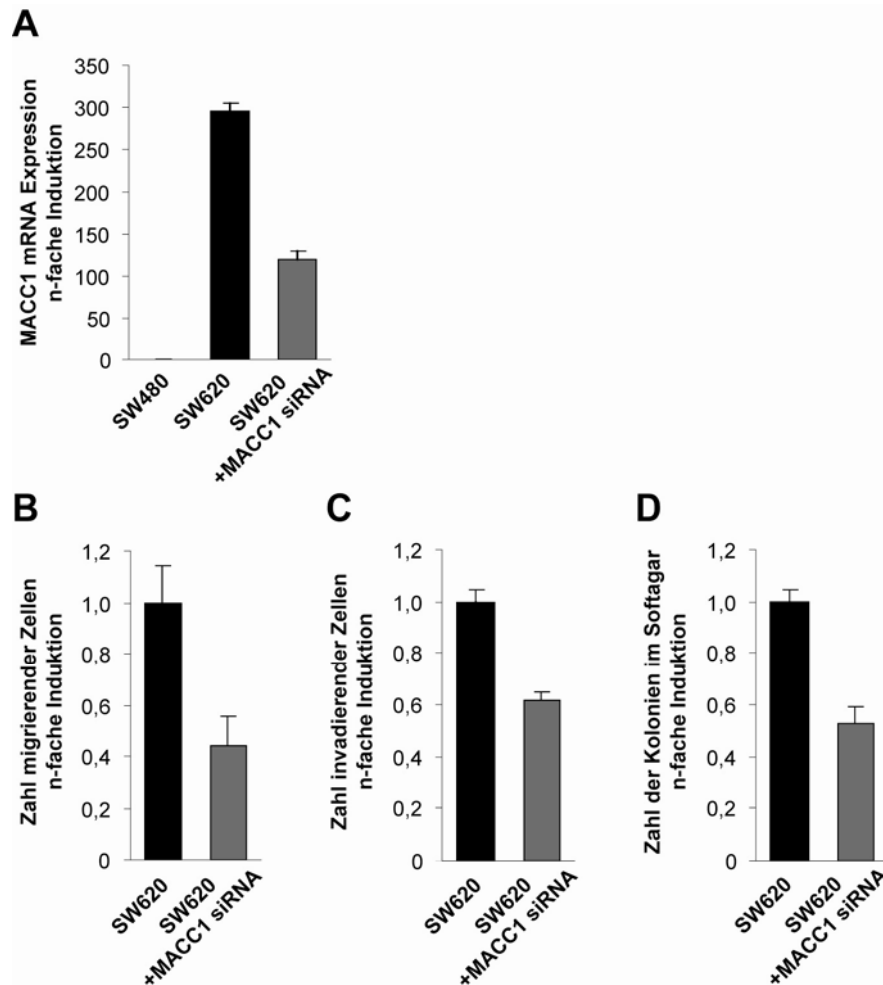
MACC1 Transfektanten zeigten eine fast dreifach erhöhte Kolonienzahl im Vergleich zur untransfizierten Tumor-Zelllinie (Abb 3.6). Somit verbessert eine erhöhte MACC1-Expression das Potential des adhäsions-unabhängigen Wachstums entscheidend. Die Genspezifität des Effektes konnte mit MACC1 siRNA bestätigt werden: die Applikation reduzierte die Zahl der gebildeten Kolonien um ca. 50%. Wie in den zuvor beschriebenen biologischen Assays sind die SH3- und die PXXP-Domäne für die Funktionalität von MACC1 in Bezug auf das adhäsionsfreie Wachstum von zentraler Bedeutung: Alle drei MACC1-Deletionsvarianten zeigten keine veränderte Kolonienzahl im Vergleich zur parentalen Tumorzelllinie.

### **3.3 MACC1 reguliert Migration, Invasion und Proliferation in der endogen MACC1-exprimierenden Zelllinie SW620**

Es konnte gezeigt werden, dass die MACC1-Überexpression in der Tumorzelllinie SW480 Migration, Invasion und adhäsions-unabhängiges Wachstum induziert. Um die Daten zu validieren wurde untersucht, ob diese biologischen Parameter in einer endogen exprimierenden Zelllinie ebenfalls durch MACC1 reguliert sind. Hierzu wurde aus dem Spektrum der auf MACC1-

Expression getesteten Kolonkarzinom-Zelllinien eine Linie mit hohem intrinsischen MACC1-Niveau ausgewählt.

Die Zelllinie SW620 wurde aus einer Lymphknotenmetastase des gleichen Patienten gewonnen, aus dessen Primärtumor bereits die SW480 Zellen generiert wurden. SW620 Zellen zeigen im Vergleich zu SW480 eine 300fach erhöhte intrinsische MACC1 Expression. Aus diesem Grund wurde SW620 parallel als endogen hoch MACC1-exprimierendes Vergleichs-Modell eingesetzt.<sup>150,169</sup>



**Abb. 3.7: Endogenes MACC1 reguliert Migration, Invasion und adhäsions-unabhängiges Wachstum in SW620 Zellen.**

(A) Expressionsanalyse mittels qRT-PCR: Die Zelllinie SW620 zeigt eine 300fach höhere endogene MACC1-Expression als SW480. Durch Transfektion mit MACC1 siRNA konnte das Expressionsniveau um ca. 60 % gesenkt werden. Die Zahl migrierender (B) und invadierender Zellen (C) wurden durch MACC1 siRNA-Transfektion deutlich reduziert. Die Menge der im Softagar gebildeten Kolonien (D) wurde durch MACC1 siRNA ebenfalls stark vermindert.

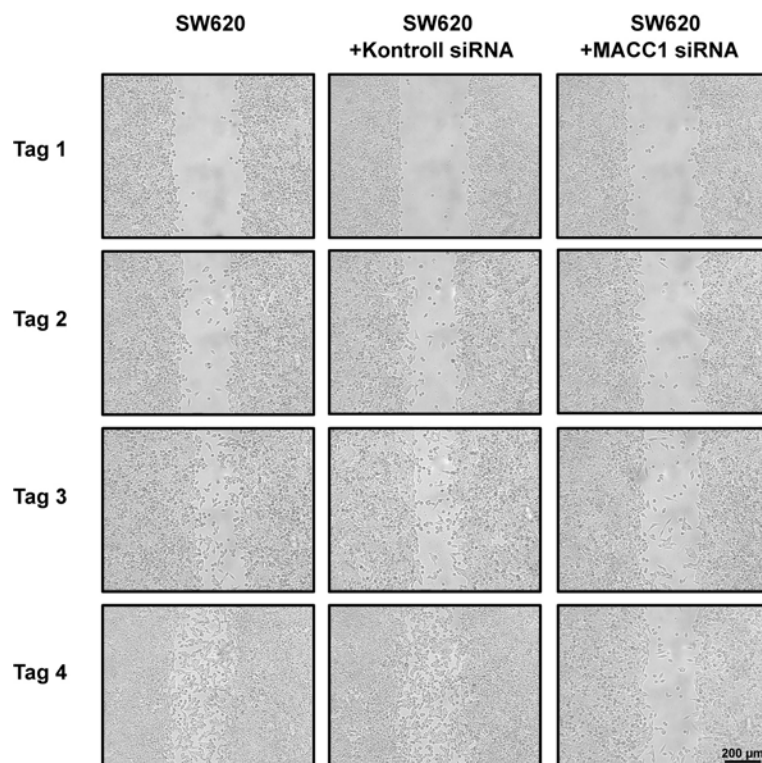
Zunächst wurde das MACC1 Expressionsprofil der SW620 Zellen mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 3.7A). Die Zellen zeigten ein um das 300fache erhöhte Expressionsniveau im Vergleich zur Zelllinie des Primärtumors SW480. Parallel

wurde die Funktionalität der MACC1 siRNA geprüft. Die Expression konnte auf ca. 40% reduziert werden.

SW620 Zellen wurden darauf hin mit MACC1 siRNA transfiziert und in den unter 3.2.1-3.2.3 beschriebenen biologischen Assays analysiert, um den MACC1-spezifischen Effekt auf Migration, Invasion und adhäsionsfreies Wachstum nachzuweisen.

Die Transfektion von MACC1-spezifischer siRNA zeigte in allen durchgeführten Assays einen deutlichen Effekt auf das biologische Verhalten der SW620 Zellen. Sowohl die Migrationsrate, als auch die Invasion und die Zahl der im Softagar gebildeten Kolonien wurden durch MACC1 siRNA deutlich vermindert (Abb. 3.7 B,C,D). Auch die gerichtete Migration der Zellen wurde durch MACC1 siRNA deutlich verringert (Abb 3.8). Die Transfektion von Kontroll siRNA hatte dagegen keinen Effekt auf einen der analysierten biologischen Parameter.

Somit wurde gezeigt, dass MACC1 auch in der endogen exprimierenden Zelllinie SW620 für die Regulation der für das metastatische Potential einer Tumorzelle essentiellen Prozesse wie Migration, Invasion und adhäsions-unabhängiges Wachstum von großer Bedeutung ist.



**Abb. 3.8: MACC1 siRNA verringert die gerichtete Migration endogen MACC1-exprimierender Kolonkarzinomzellen.**

Wundheilungsassay MACC1 siRNA transfizierter SW620 Zellen. Kontroll siRNA zeigte keinen Einfluß auf die gerichtete Migration. MACC1 siRNA Behandlung führte dagegen zu einer deutlichen Verzögerung der Migration der SW620 Zellen in den Wundbereich.



### 3.4 MACC1 aktiviert den HGF/Met-Signalweg in Tumorzellen

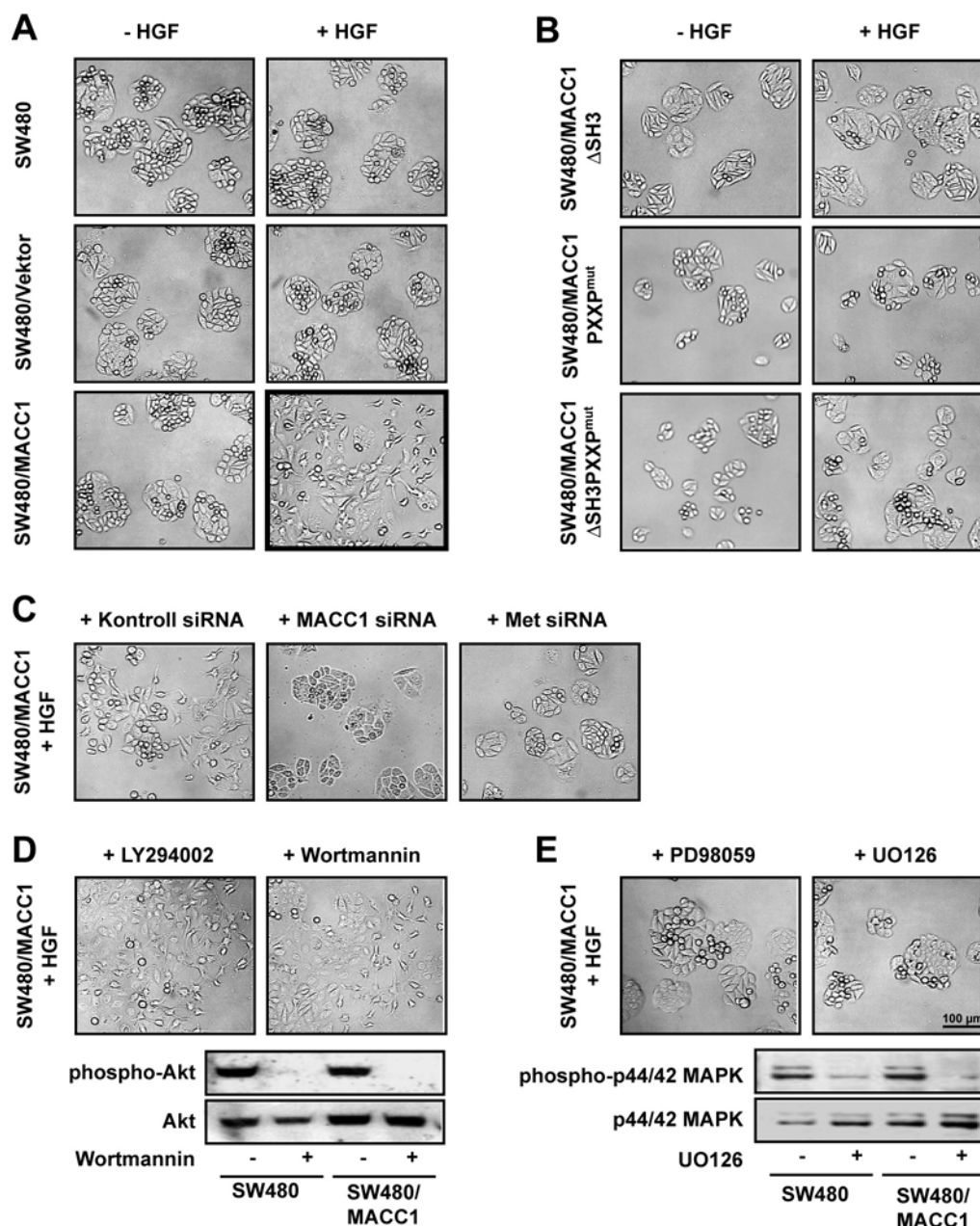
#### 3.4.1 HGF induziert die epitheliale-mesenchymale Transition in Abhängigkeit der MACC1-Expression

Die *in silico* identifizierte MACC1-Domänenstruktur ist typisch für Proteine der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Signaltransduktion. So zeigen z.B. Proteine des MAPK-Signalweges eine ähnliche Domänenstruktur wie MACC1.<sup>142</sup> Die SH3-Domäne und die PXXP-Domäne vermitteln die Protein-Protein-Interaktion. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste führt zur Aktivierung des Signalmoleküls. In den biologischen Assays (3.2) konnte gezeigt werden, dass die MACC1-Expression Metastasierungs-assoziierte Prozesse wie Migration, Invasion und adhäsionsfreies Wachstum induziert.

Um beteiligte RTKs zu identifizieren, wurden verschiedene Wachstumsfaktoren an den MACC1-Transfektanten getestet. Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) ist der Ligand von Met, einer RTK die Proliferation, invasives Wachstum und die Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp (EMT) steuert. Ein Modellsystem für die Untersuchung der durch Met-Signaltransduktion induzierten zellulären Antwort ist der sogenannte Scatterassay. Epitheliale Zellen (im klassischen Assay die Zelllinie MDCK) reagieren auf die Applikation von HGF mit stark erhöhter Motilität und Auflösung der epithelialen Zellcluster. Die Zellen weisen nach Induktion der EMT durch HGF einen Fibroblasten-artigen, spindelförmigen Phänotyp auf.

Parentale SW480 Zellen und MACC1-Transfektanten zeigen in der Zellkultur das typische epitheliale Wachstum in Zellclustern mit vollständiger Zell-Zell-Adhäsion benachbarter Zellen (Abb. 3.9A). Die HGF-Applikation führt in MACC1-Transfektanten jedoch zu erheblichen Veränderungen der Zellmorphologie: Die epithelialen Zellcluster lösen sich auf, die Zellen zeigen eine stark erhöhte Migration und den für mesenchymale Zellen typischen, spindelförmigen Phänotyp. Die Zell-Zell-Kontakte werden vollständig getrennt. In den MACC1-Domänenmutanten konnten diese zellulären Veränderungen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.9B). Somit sind SH3- und PXXP-Motiv notwendig für die MACC1-vermittelte Aktivierung des HGF/Met-Signalweges.

Um nachzuweisen, dass es sich bei diesen drastischen morphologischen Veränderungen um einen spezifischen Effekt der MACC1-Überexpression handelt, wurden die Zellen vor HGF-Applikation mit MACC1 siRNA transfiziert. Parallel wurde Met-spezifische siRNA transfiziert, um experimentell sicherzustellen, dass es sich bei dem gezeigten Effekt tatsächlich um einen Met-vermittelten Prozess handelt. Sowohl MACC1 siRNA als auch Met siRNA inhibieren den mesenchymalen Phänotyp der MACC1-Transfektanten nach HGF-Induktion (Abb. 3.9C). Es handelt sich demnach um eine MACC1-vermittelte Aktivierung des HGF/Met-Signalweges.



**Abb. 3.9: Der Hepatocyte-growth-factor (HGF) induziert die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) in MACC1-Transfektanten.**

Scatterassay der stabilen MACC1 Klone. Die Zellen wurden in 96 well Platten angelegt und nach 24 h jeweils mit 20 U/ml HGF behandelt. MACC1 Transfektanten, jedoch nicht die parentale Linie und die Vektor-Transfektante zeigen nach Induktion mit HGF die Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp (A). In den MACC1-Deletionsvarianten zeigt die HGF-Applikation dagegen keinen Effekt (B). Sowohl MACC1-, als auch Met-spezifische siRNA waren in der Lage die Dispersion der Kolonien zu unterbinden (C).

(D,E) Einsatz von PI3K-Inhibitoren (LY294002, Wortmannin) (D) und MEK1/2-Inhibitoren (PD98059) (E) zur Identifizierung der beteiligten Signaltransduktionswege. Die Funktionalität der Inhibitoren wurde im Western Blot mittels phospho-Akt und phospho-p44/42 MAPK spezifischer-Antikörper überprüft. Die Abbildung zeigt beispielhaft die effiziente Inhibierung der Akt Phosphorylierung durch den Wortmannin

(D), und der p44/42 MAPK Phosphorylierung durch MEK1/2 (E). Nur die MEK1/2-Inhibitoren konnten das Scattering der MACC1 Transfektanten inhibieren (E).

Für die komplexe zelluläre Antwort nach HGF-Induktion sind vor allem der MAPK-Signalweg und der Akt-Signalweg von Bedeutung. Zur genaueren Identifizierung des beteiligten Signalweges wurden die PI3K-Inhibitoren LY294002 bzw. Wortmannin und die MEK1/2-Inhibitoren PD98059 bzw. UO126 eingesetzt. LY294002 und Wortmannin inhibieren die Phosphorylierung von Akt durch die PI3K. PD98059 bzw. UO126 inhibieren die Phosphorylierung der p44/42 MAPK durch MEK1/2. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung eines zentralen Signalmoleküls des Akt bzw. MAPK-Signalweges wird somit unterbunden. Die Funktionalität der Inhibitoren wurde im Western Blot geprüft. Abbildung 3.9D und E zeigen exemplarisch die fast vollständige Inhibierung der Akt-Phosphorylierung durch Wortmannin und der p44/42 MAPK-Phosphorylierung durch UO126.

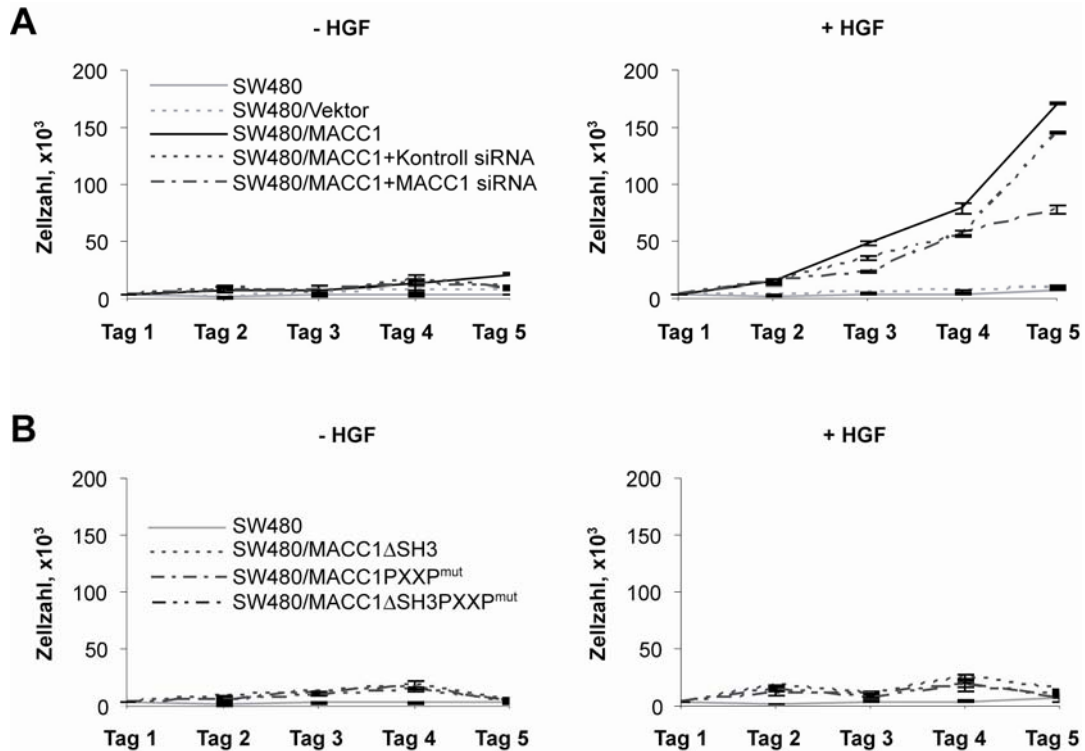
Im Scatterassay konnte die Dispersion der Kolonien nach HGF-Induktion nur durch die MEK1/2-Inhibitoren signifikant reduziert werden. Die PI3K-Inhibitoren zeigten dagegen keinen Effekt. Die MACC1-induzierten Effekte werden demnach über HGF/Met-aktivierte MAPK-Signale vermittelt.

### **3.4.2 MACC1 vermittelt die HGF-abhängige Proliferation**

Mit Hilfe des Scatterassays konnte gezeigt werden, dass in den MACC1-überexprimierenden Zellen eine Aktivierung des HGF/Met-Signaltransduktionsweges vorliegt. Ein weiteres Kennzeichen aktivierter HGF/Met-Signale ist die Induktion der Proliferation. Um das Ergebnis des Scatterassays zu validieren wurde deshalb untersucht, ob die Applikation von HGF auch Einfluss auf die Wachstumsrate der MACC1-Transfektanten hat.

Zur Analyse der HGF-abhängigen Proliferation wurden die Zellen entweder in serumfreiem, oder mit 20 U/ml HGF supplementiertem Medium gehalten und alle 24 Stunden die Zellzahl bestimmt (Abb. 3.10).

Nicht induzierte MACC1-Transfektanten zeigten keine Wachstumsunterschiede zur parentalen Zelllinie und den Vektor-Transfektanten. Dies galt auch für die stabilen MACC1-Domänenvarianten. Nach HGF-Induktion war dagegen eine sehr starke Induktion der Proliferation in den MACC1-exprimierenden Zellen zu beobachten. In den parentalen Zellen und den MACC1 Deletionsvarianten hatte die Applikation des Wachstumsfaktors keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. Parallel wurde der Einfluss von MACC1 siRNA überprüft (Abb. 3.10A). Nicht induzierte Zellen zeigten keine Proliferationsunterschiede. In HGF-behandelten MACC1-Zellen resultierte die siRNA-Transfektion jedoch in einer signifikanten Verminderung des Wachstums. Somit führt die MACC1-Expression zu einer Induktion der HGF/Met-vermittelten Proliferation.



**Abb. 3.10: HGF induziert die Proliferation in MACC1 Transfektanten.**

Proliferationsassay. Die Zellen wurden in 48 well Platten eingesät und in serumfreiem Medium gehalten. HGF wurde in einer Konzentration von 20 U/ml zugegeben. Alle 24 h wurden Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. MACC1-Transfektanten zeigten nach HGF Applikation eine starke Induktion der Proliferation (A). Dieses HGF-abhängige Wachstum war durch MACC1 siRNA-Transfektion teilweise revertierbar. In den MACC1-Domänenvarianten war dagegen nach HGF-Zugabe keine erhöhte Proliferation nachweisbar (B).

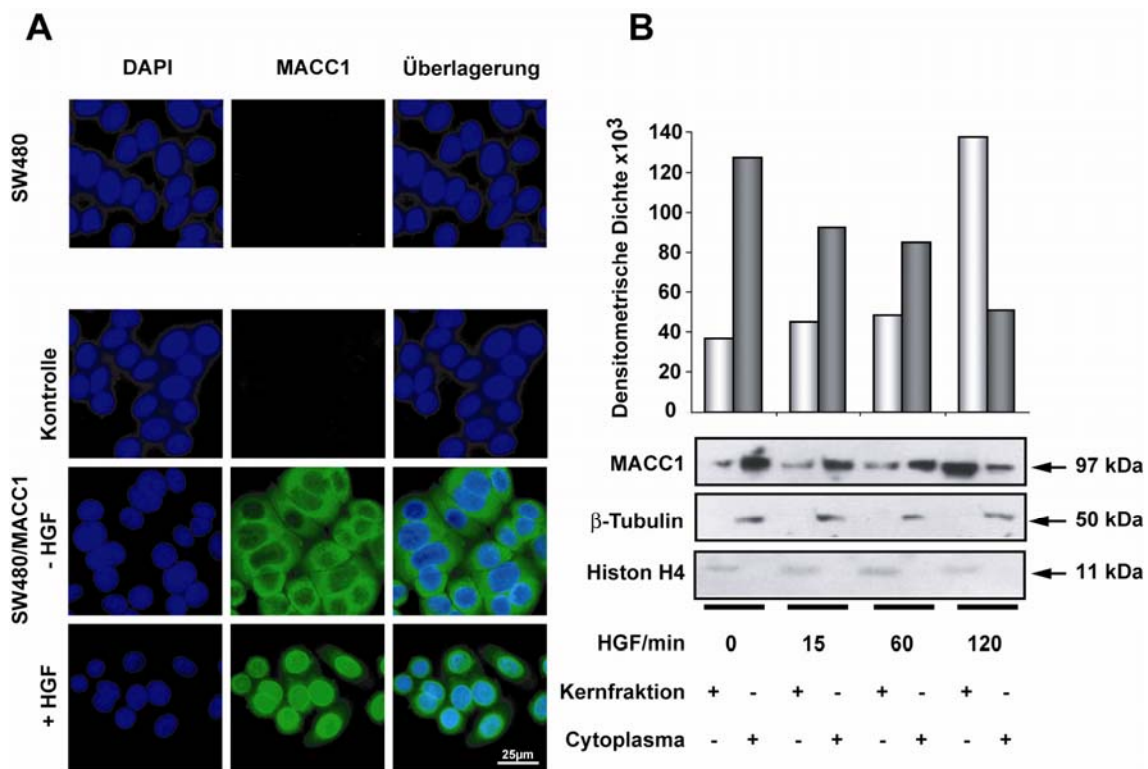
### 3.4.3 HGF-Induktion führt zur Translokation von MACC1 in den Zellkern

Um den molekularen Mechanismus der MACC1 regulierten HGF/Met-Signaltransduktion zu untersuchen wurde im Folgenden der Einfluss der HGF-Applikation auf die subzelluläre Lokalisation von MACC1 analysiert.

Die stabilen MACC1-Transfektanten wurden für einen Zeitraum von 2 Stunden mit 20 U/ml HGF inkubiert und darauf folgend die Lokalisation von MACC1 mittels Immunfluoreszenz bestimmt (Abb. 3.11A). In den parentalen Zellen wurde keine MACC1 Expression nachgewiesen, da die Detektion über einen V5-spezifischen Antikörper erfolgte, der ausschließlich das exogene MACC1-V5 Fusionsprotein detektiert. MACC1-Transfektanten zeigten im uninduzierten Zustand eine vorrangig cytoplasmatische MACC1-Lokalisation. Nach zweistündiger HGF-Inkubation konnte in den Zellen dagegen eine Translokation von MACC1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern nachgewiesen werden.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden nochmals MACC1 exprimierende Zellen für einen Zeitraum von 15-120 min mit HGF induziert und die Kernfraktion bzw. die cytoplasmatische Fraktion isoliert. Anschließend wurde im

Western Blot die subzelluläre MACC1-Lokalisation in Abhängigkeit von der Dauer der HGF-Induktion analysiert (Abb. 3.11B).



**Abb. 3.11: HGF induziert die nukleäre Translokation von MACC1.**

Immunfluoreszenz und Immunoblotting MACC1-transfizierter Zellen vor und nach HGF-Induktion.

(A) Parentale SW480 Zellen und MACC1-Transfektanten wurden für 120 min mit 20 U/ml HGF inkubiert und die MACC1-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Die Detektion erfolgte mit einem V5-spezifischen primären und einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper. Uninduzierte MACC1-Transfektanten zeigten eine vorwiegend cytoplasmatische, HGF-induzierte Zellen dagegen eine vorwiegend nukleäre MACC1-Lokalisation. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne primären Antikörper mitgeführt.

(B) Zur Verifizierung wurden Zellen nochmals mit 20 U/ml HGF induziert und 15, 60 und 120 min nach Induktion die Kern- und die cytoplasmatische Fraktion präpariert. Die MACC1-Lokalisation in den Fraktionen wurde mittels V5-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Zusätzlich wurden die im Western-Blot detektierten Signale densitometrisch ausgewertet. Western-Blot und Densitometrie zeigen in Zeitabhängigkeit der HGF-Induktion einen starken Anstieg der MACC1-Konzentration in der Kernfraktion und einen Konzentrationsabfall im Cytoplasma.

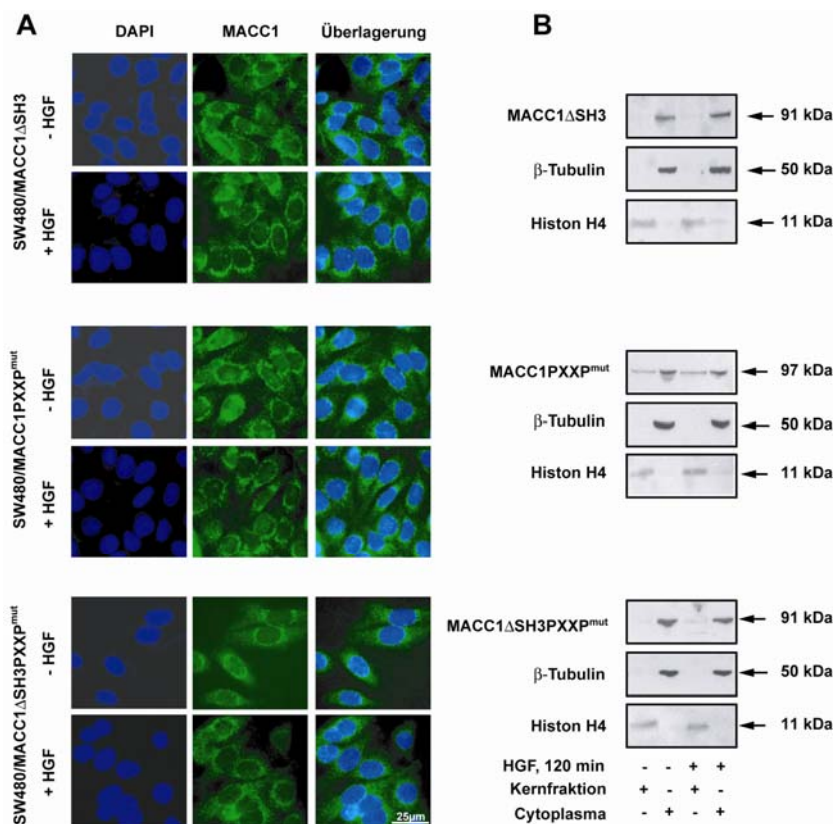
Nicht induzierte Zellen zeigten eine vorrangig cytoplasmatische MACC1-Lokalisation. Bereits 15 min nach HGF-Induktion war jedoch ein Abfall der cytoplasmatischen MACC1-Konzentration nachweisbar. Nach 120 min HGF Behandlung zeigten die Zellen einen starken Konzentrationsanstieg kernständigen MACC1s, während im Cytoplasma nur noch geringe Mengen des Proteins nachweisbar waren. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Hilfe der Markerproteine Histon H4 (Kernfraktion) und  $\beta$ -Tubulin (Cytoplasma) bestätigt.

Die im Western-Blot detektierten Signale wurden zusätzlich densitometrisch erfasst (Abb. 3.11B). Hier wird die nukleäre MACC1-Translokation nochmals deutlich: Nicht induzierte Zellen zeigen etwa 70% des zellulären MACC1 im Cytoplasma. In HGF induzierten Zellen liegen nach 120 min dagegen nahezu umgekehrte Verhältnisse vor. Hier liegt der MACC1 Anteil im Kern bei etwa 70%. Somit induziert HGF eine Translokation von MACC1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern.

Im Folgenden wurde analysiert, welche Bedeutung den identifizierten MACC1-Domänen für die HGF-vermittelte nukleäre Translokation zukommt.

Hierzu wurde der Einfluss von HGF auf die subzelluläre Lokalisation der stabil exprimierten MACC1-Domänenvarianten untersucht. Die Abbildung 3.12A zeigt je einen repräsentativen Klon der drei Domänenvarianten. In keinem der drei Ansätze konnte nach 120 min HGF-Behandlung eine Translokation der jeweiligen MACC1-Expressionsvariante in den Kern nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch Immunoblotting isolierter Kern- und cytoplasmatischer Fraktionen aller drei Varianten bestätigt.

MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> zeigten auch nach HGF-Behandlung eine gleich bleibend hohe Lokalisation im Cytoplasma. Somit haben sowohl die SH3- als auch die PXXP-Domäne eine essentielle Funktion bei der HGF-induzierten Translokation von MACC1 in den Zellkern. Die Deletion nur einer der beiden Motive führt zu einer HGF unabhängigen, vorrangig cytoplasmatischen Lokalisation von MACC1 (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Die MACC1 SH3-Domäne und die PXXP-Domäne haben essentielle Funktion für die HGF-induzierte Translokation von MACC1 in den Zellkern.**

Immunfluoreszenz und Immunoblotting der MACC1-Deletionsvarianten vor und nach HGF-Induktion.

(A) Die Zellen je eines repräsentativen Klonen wurden wie oben beschrieben für 120 min mit HGF induziert und die Lokalisation der entsprechenden MACC1 Deletionsvariante mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Keine der drei Deletionsvarianten zeigte nach HGF Behandlung eine nachweisbare MACC1-Translokation in der Zellkern.

(B) Immunoblotting von Kern- und cytoplasmatischen Fraktionen unbehandelter und HGF-behandelter MACC1 $\Delta$ SH3-, MACC1PXXP<sup>mut</sup>- und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>-Transfektanten. Die MACC1-Domänenmutanten wurden mittels V5-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Histon H4 und  $\beta$ -Tubulin dienten als Marker für die beiden zellulären Fraktionen. Auch im Western-Blot war in den MACC1-Domänenmutanten nach 120 minütiger HGF-Applikation keine Kerntranslokation detektierbar.

### 3.5 MACC1 interagiert mit dem Promotor des HGF-Rezeptors Met

#### 3.5.1 MACC1 reguliert die Promotor-Aktivität des HGF-Rezeptors Met

MACC1 exprimierende Zellen zeigen eine Aktivierung des HGF/Met Signalweges und eine HGF induzierte Translokation von MACC1 in den Zellkern. Um den Mechanismus der MACC1-vermittelten HGF/Met-Signaltransduktion genauer zu analysieren, wurde mittels CAT-Reporterassays die Aktivität des Promotors der Rezeptor-Tyrosinkinase Met in parentalen SW480 Zellen und MACC1-Transfektanten verglichen.

Das verwendete, pCAT3Basic-basierte Reportersystem mit den verschiedenen Met-Promotorvarianten wurde freundlicherweise von Y. Liu zur Verfügung gestellt.<sup>145</sup> Das längste analysierte Met-Promotorkonstrukt kodierte für 2600 bp upstream des Transkriptionsstarts (2.6met-CAT). Zusätzlich wurden Deletionsvarianten des Promotors eingesetzt, um den für die MACC1-spezifische Aktivierung relevanten Sequenzbereich einschränken zu können. Eine Übersicht über die eingesetzten Met-Promotorkonstrukte findet sich in Abbildung 3.13.

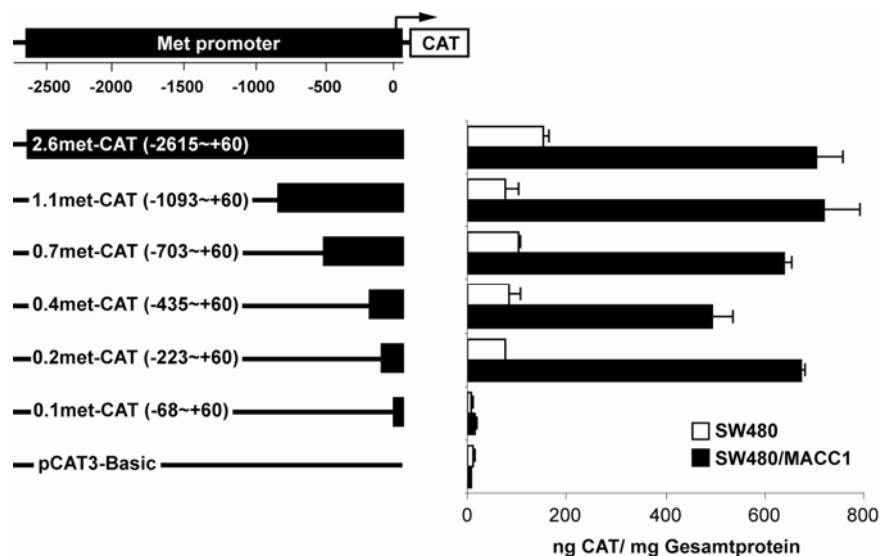


Abb. 3.13. MACC1 induziert die Met-Promotoraktivität.

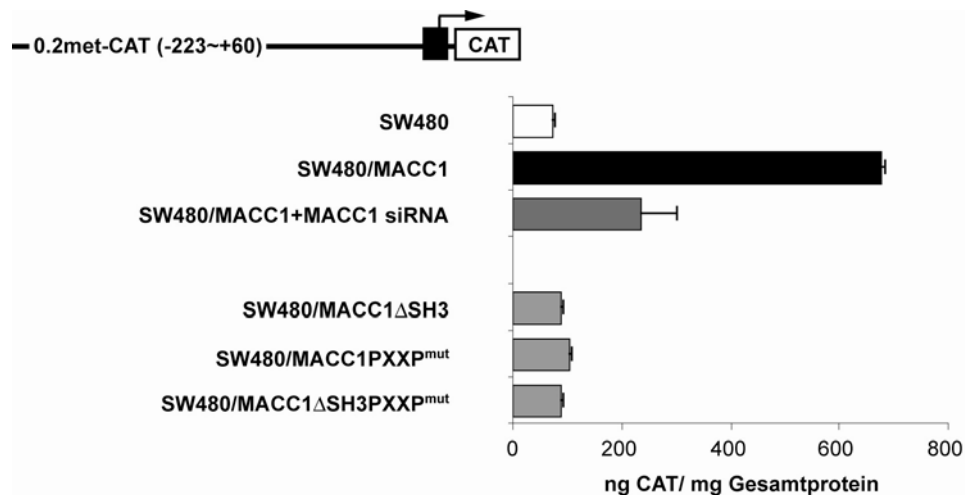


CAT-ELISA in parentalen und MACC1-transfizierten Zellen. Die CAT-Expressionskonstrukte tragen definierte Fragmente des Met-Promotors.<sup>145</sup> Beide Zelllinien wurden parallel mit den gezeigten Met-Promotorvarianten transfiziert und nach 48 h die CAT-Expression im ELISA quantifiziert. Das 0.2met Promotorfragment zeigte eine stark erhöhte Aktivität in MACC1-Transfektanten, verglichen mit den parentalen SW480 Zellen. Diese Induktionsrate war stabil in allen längeren Met-Promotorkonstrukten 0.4met-CAT, 0.7met-CAT, 1.1met-CAT, 2.6met-CAT.

Nach Transfektion mit dem kürzesten Met-Promotorfragment 0.1met-CAT wurde in beiden Zelllinien eine vergleichbare Expression detektiert. Mit dem 0.2met-CAT Konstrukt transfizierte MACC1-Zellen zeigten dagegen eine 10fach erhöhte Reporterexpression im Vergleich zur parentalen Zelllinie (Abb. 3.13). Die Transfektion der 0.4met-CAT, 0.7met-CAT, 1.1met-CAT und 2.6met-CAT-Reporterkonstrukte in stabile MACC1-Klone führte zu ähnlich hoher Induktion der CAT-Expression.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass MACC1 entweder direkt oder indirekt mit dem Sequenzbereich von -223 bis -68 des 0.2met-CAT Fragments des Met-Promotors interagiert.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der erhöhten Met-Promotoraktivität in den MACC1-Transfektanten tatsächlich um einen MACC1-spezifischen Effekt handelt, wurden die Zellen vor Transfektion mit dem 0.2met-CAT Reporterkonstrukt mit MACC1-spezifischer siRNA behandelt. Die Reduktion der MACC1 Expression mittels siRNA hat eine signifikante Reduktion der Met Promotoraktivität zur Folge (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Die erhöhte Met-Promotoraktivität ist MACC1-spezifisch und wird bedingt durch die MACC1-Domänenstruktur. S**

W480/MACC1 Zellen wurden mit MACC1 siRNA behandelt und anschließend mit dem 0.2met-CAT Promotorkonstrukt transfiziert. MACC1 siRNA-transfizierte Zellen zeigten eine Reduktion der Reporterexpression auf etwa 35%.

Parallel wurde die CAT-Expression in 0.2met CAT transfizierten MACC1-Deletionsvarianten MACC1ΔSH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1ΔSH3PXXP<sup>mut</sup> untersucht. Alle drei MACC1-Deletionsvarianten zeigten eine Reporter-Expression auf Niveau der parentalen Zelllinie.

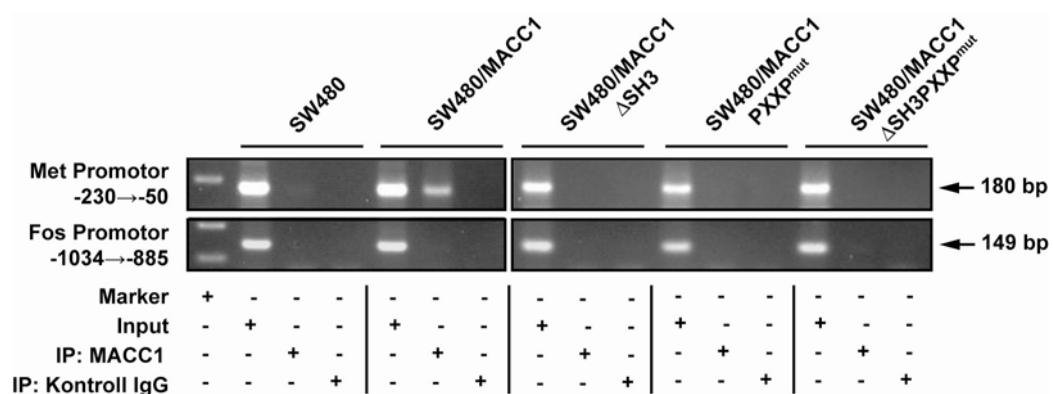


Um die Relevanz der Domänenstruktur für die Met-Promotor-Aktivierung zu untersuchen, wurden auch die stabilen Klone der Deletionsvarianten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> mit dem 0.2met-CAT Konstrukt transfiziert und die Reporter-Gen-Expression quantifiziert. In keiner der Deletionsvarianten war eine Induktion der Promotoraktivität nachweisbar. Die Deletion sowohl der SH3-Domäne als auch des PXXP-Motivs führte somit zum Funktionsverlust des Proteins.

### 3.5.2 MACC1 bindet an den endogenen Met-Promotor

Mit Hilfe der CAT-Reporterassays wurde gezeigt, dass die MACC1-Expression zu einer Induktion der Met-Promotoraktivität führt. Die Interaktion von MACC1 erfolgt den Daten des Reporterassays zufolge mit dem Sequenzbereich von -223 bis -68 des Met-Promotors. Um die direkte Bindung von MACC1 an dieses Fragment des endogenen Met-Promotors nachzuweisen, wurden Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) durchgeführt.<sup>160</sup>

Hierbei werden die an die DNA gebundenen Proteine mittels Paraformaldehyd an die DNA gekoppelt und mit Hilfe spezifischer Antikörper immunpräzipitiert. In diesem Falle wurde ein V5-spezifischer Antikörper eingesetzt. Im Anschluss wird die an das präzipitierte Protein gebundene DNA isoliert und mittels PCR die Protein-bindende Promotorsequenz amplifiziert – in dieser Analyse der betreffende Sequenzbereich des Met-Promotors von -230 bis -50 bp.



**Abb. 3.15: MACC1 interagiert mit dem endogenen Met-Promotor.**

Chromatin-Immunpräzipitation zum Nachweis der Bindung von MACC1 an die Met-Promotorregion -223 bis -68. Das an die DNA gebundene MACC1 wurde mittels V5-spezifischer Antikörper präzipitiert, die DNA isoliert und in einer PCR die Met-Promotorregion von -230 bis -50 amplifiziert. Als Input wurde die aus 10 % des Ausgangslysats isolierte DNA in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurde eine unspezifische Isotypenkontrolle verwendet, die PCR-Spezifität wurde mittels Met-unassoziierter, Fos-spezifischer Primer gezeigt. In SW480/MACC1-Transfektanten wurde nach IP mit V5-spezifischen Antikörpern ein Met-Promotor PCR-Produkt amplifiziert. In den Präzipitaten der parentale Linie und der drei MACC1-Domänenvarianten war die Met-Promotorsequenz dagegen nicht nachweisbar.

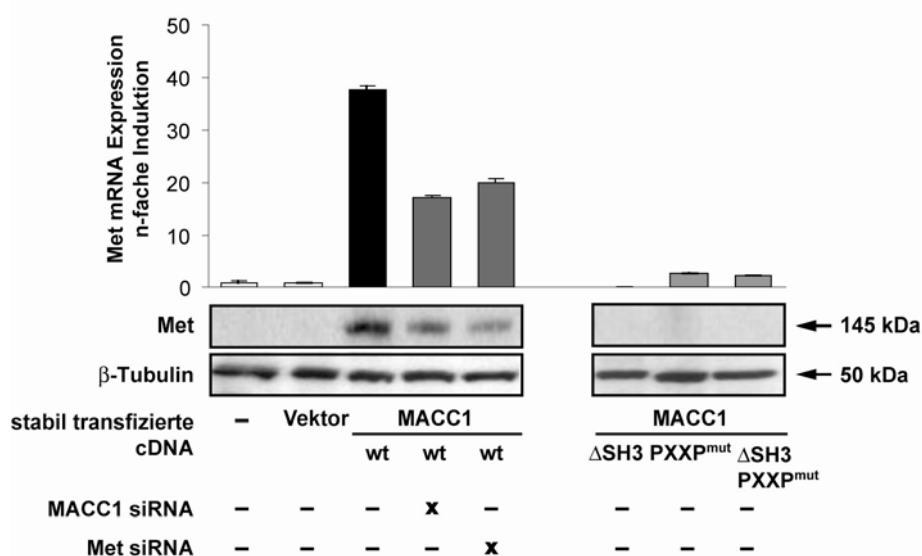
Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde sowohl mit den parentalen Zellen, als auch der MACC1 Transfektante und den drei MACC1 Deletionsvarianten durchgeführt (Abb. 3.15). In den MACC1-Transfektanten konnte nach Immunpräzipitation mit V5-Antikörper der Sequenzbereich von -230 bis -50 bp des Met Promotors amplifiziert werden. Das heißt, MACC1 bindet innerhalb dieses Sequenzabschnitts an den endogenen Met-Promotor. Präzipitationen mit Kontroll IgG und PCR-Amplifikationen mit Met-unspezifischen Primern zeigten kein PCR-Signal. Die Spezifität des Nachweises ist demnach gewährleistet.

In den parentalen Zellen und den drei MACC1-Deletionsvarianten fiel die Amplifikation dagegen negativ aus. Es konnte keine Bindung von MACC1 an den Met-Promotor nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen des CAT-ELISAs. Somit konnte mit Hilfe von CAT-Reporterassays und Chromatin-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, dass MACC1 an den Met Promotor im Bereich -223 bis -68 bindet und die Promotoraktivität erhöht.

### 3.6 MACC1 reguliert die Expression des HGF-Rezeptors Met in Tumorzellen

#### 3.6.1 Met ist ein direktes, transkriptionelles Zielgen von MACC1

Die Reporterassays zeigten eine etwa 10fache Induktion der Met Promotoraktivität in MACC1 Transfektanten, im Vergleich zu parentalen Zellen. Zusätzlich konnte mittels Chromatin-Immunpräzipitation eine Bindung von MACC1 an den Met-Promotor nachgewiesen werden. Deshalb wurde im Folgenden analysiert, ob die Überexpression von MACC1 auch zu einer Erhöhung der endogenen Met-Expression führt. Die Analyse der Met-Expression erfolgte mittels Met-spezifischer qRT-PCR und Western-Blot. Parallel wurden MACC1-spezifische und Met-spezifische siRNAs eingesetzt, um die Genspezifität der Ergebnisse zu validieren (Abb. 3.16).



**Abb 3.16: MACC1 induziert die Met-Expression in Tumorzellen.**

Met-Expressionsanalyse in parentalen SW480 Kolonkarzinomzellen und MACC1-Transfektanten mittels Met-spezifischer qRT-PCR und Western-Blot. MACC1-Transfektanten zeigten im Vergleich zur parentalen Linie eine stark erhöhte Met-Expression. Diese konnte sowohl durch MACC1-, als auch durch Met-spezifische siRNA signifikant reduziert werden. Die drei Domänenvarianten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> zeigten Met-Expressionslevel auf Niveau der parentalen Linie.

Parentale SW480 Zellen und Vektortransfektanten zeigten kaum detektierbare Met-Expression. In MACC1-Transfektanten konnte dagegen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine etwa 40fache Induktion der Met-Expression nachgewiesen werden. Die MACC1-Genspezifität dieses Effektes wurde durch den Einsatz von MACC1 siRNA bestätigt: Die Transfektion von MACC1 siRNA führte zu einer drastischen Reduktion der Met-Expression. Die Transfektion von Met siRNA verminderte ebenfalls effizient die detektierten Met mRNA- und Proteinmengen. Somit wurde gezeigt, dass der HGF-Rezeptor Met ein direktes Zielgen von MACC1 in Kolonkarzinomzellen darstellt.

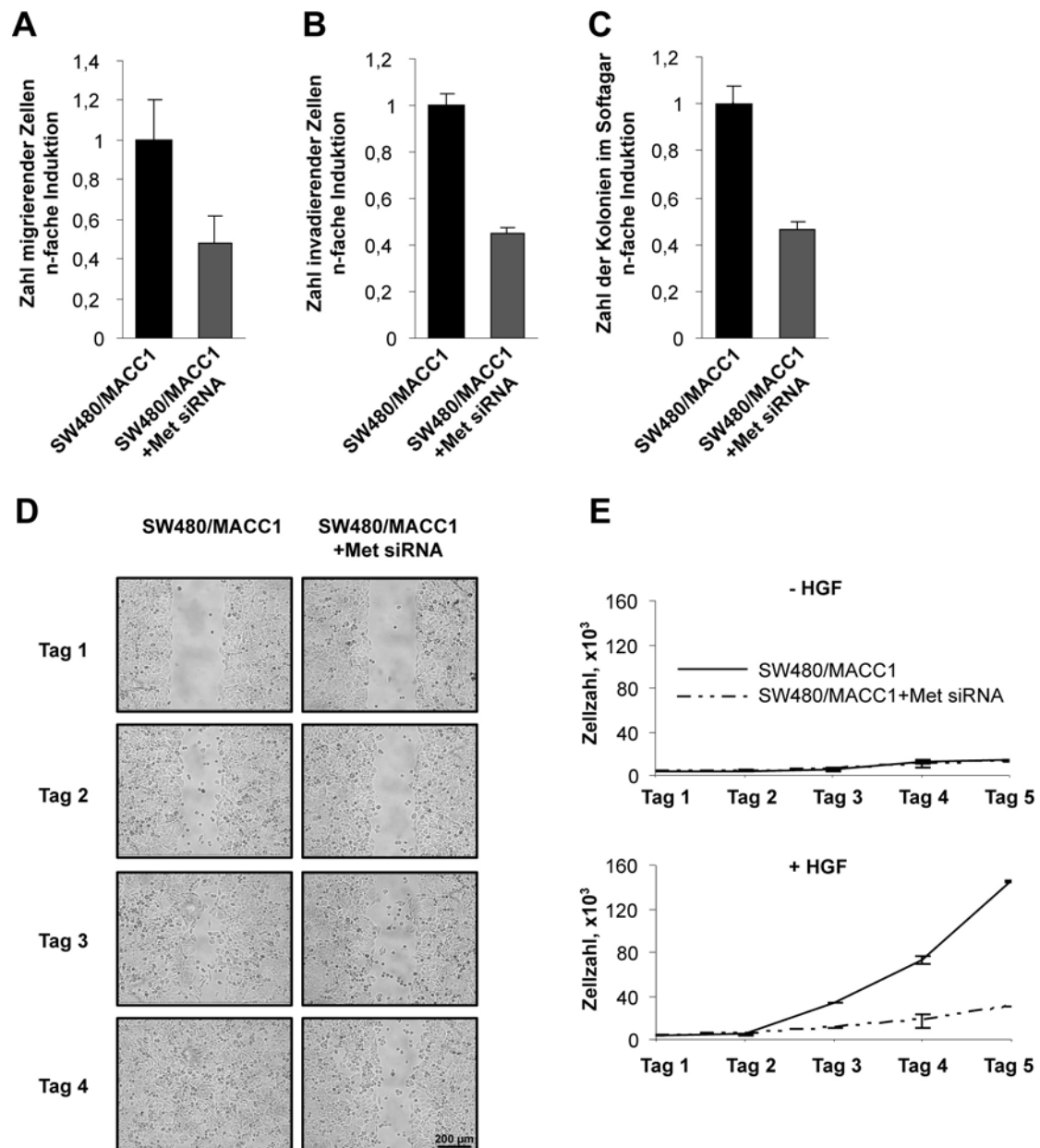
In den drei stabil transfizierten Deletionsvarianten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> konnte dagegen keine erhöhte Met Expression nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der deregulierten nukleären Translokation und fehlender Reporterogenaktivierung.

### 3.6.2 Die MACC1-induzierten biologischen Effekte werden durch HGF/Met vermittelt

Im Folgenden wurde analysiert, ob die in den MACC1-exprimierenden Zellen nachgewiesenen biologischen Effekte wie erhöhte Migration, Invasion und Proliferation tatsächlich durch die MACC1 induzierte Met-Überexpression verursacht werden. Hierzu wurden die stabilen MACC1-Transfektanten mit Met-spezifischen siRNAs transfiziert und in den bereits gezeigten Assays (siehe 3.2) deren Einfluss auf das biologische Verhalten der Zellen untersucht (Abb 3.17).

Met siRNA transfizierte Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der Motilität (Abb. 3.17A). Die Zahl der migrierenden Zellen wurde durch Met siRNA-Transfektion um die Hälfte verringert. Im Wundheilungsassay war außerdem eine deutliche Verminderung der gerichteten Migration nachweisbar: Met siRNA behandelte Zellen zeigten im Gegensatz zur Kontrolle auch nach 4 Tagen noch einen deutlichen zellfreien Wundbereich (Abb. 3.17D). Das invasive Potential der MACC1 exprimierenden Zellen wurde durch Met siRNA ebenfalls stark reduziert (Abb. 3.17B). Zusätzlich wurde die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit des Met Expressions knock-downs untersucht. In der Analyse des adhäsionsfreien Wachstums ergab sich in den Met siRNA-behandelten Ansätzen eine stark verminderte Zahl der gebildeten Kolonien im Softagar. Der Proliferationsassay erbrachte in Abhängigkeit von HGF eine deutliche, durch Met siRNA vermittelte Wachstumsreduktion in den MACC1-Transfektanten. In siRNA behandelten Ansätzen war nach 5 Tagen nur ein Viertel der in den Kontrollen bestimmten Zellzahl nachweisbar (Abb. 3.17E).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Met Expression durch Applikation von Met siRNA zur Revertierung aller gezeigten, durch MACC1 induzierten biologischen Effekte führt. Das heißt, das erhöhte migratorische, invasive und proliferative Potential der MACC1 überexprimierenden Zellen wird durch die transkriptionelle Aktivierung des HGF-Rezeptors Met vermittelt.

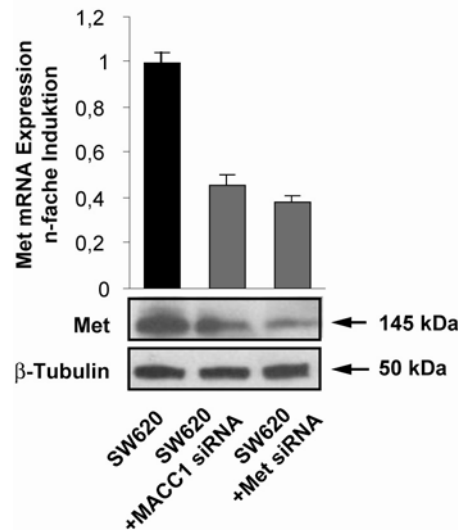


**Abb. 3.17: Die MACC1-induzierten biologischen Effekte werden über HGF/Met vermittelt.**

Migration (A), Invasion (B), Koloniebildung (C), Wundheilung (D) und Proliferation (E) in Met siRNA behandelten, stabilen MACC1-Transfektanten. Met siRNA-transfizierte Zellen zeigten reduzierte Zahlen migrierender, invadierender und adhäsionsfrei proliferierender Zellen. Die gerichtete Migration der Zellen im Wundheilungsassay wurde durch Met siRNA stark verzögert. Ohne Applikation von HGF zeigten Met siRNA behandelte Zellen und MACC1 Kontrollen ein vergleichbar niedriges Wachstum. In HGF-behandelten Zellen führte der Met Expressions- knock-down zu einer starken Reduktion der durch MACC1-induzierten Wachstumsraten.

### 3.7 Der HGF/Met-Signalweg vermittelt Motilität und Proliferation in der endogenen MACC1-exprimierenden Zelllinie SW620

Die Kolonkarzinom-Zelllinie SW620 zeigt eine stark erhöhte MACC1-Expression. Um zu untersuchen, ob auch in diesem endogenen System MACC1 die Expression des HGF-Rezeptors Met reguliert, wurde eine Met-Expressionsanalyse in MACC1- und Met siRNA behandelten SW620 Zellen durchgeführt (Abb. 3.18).

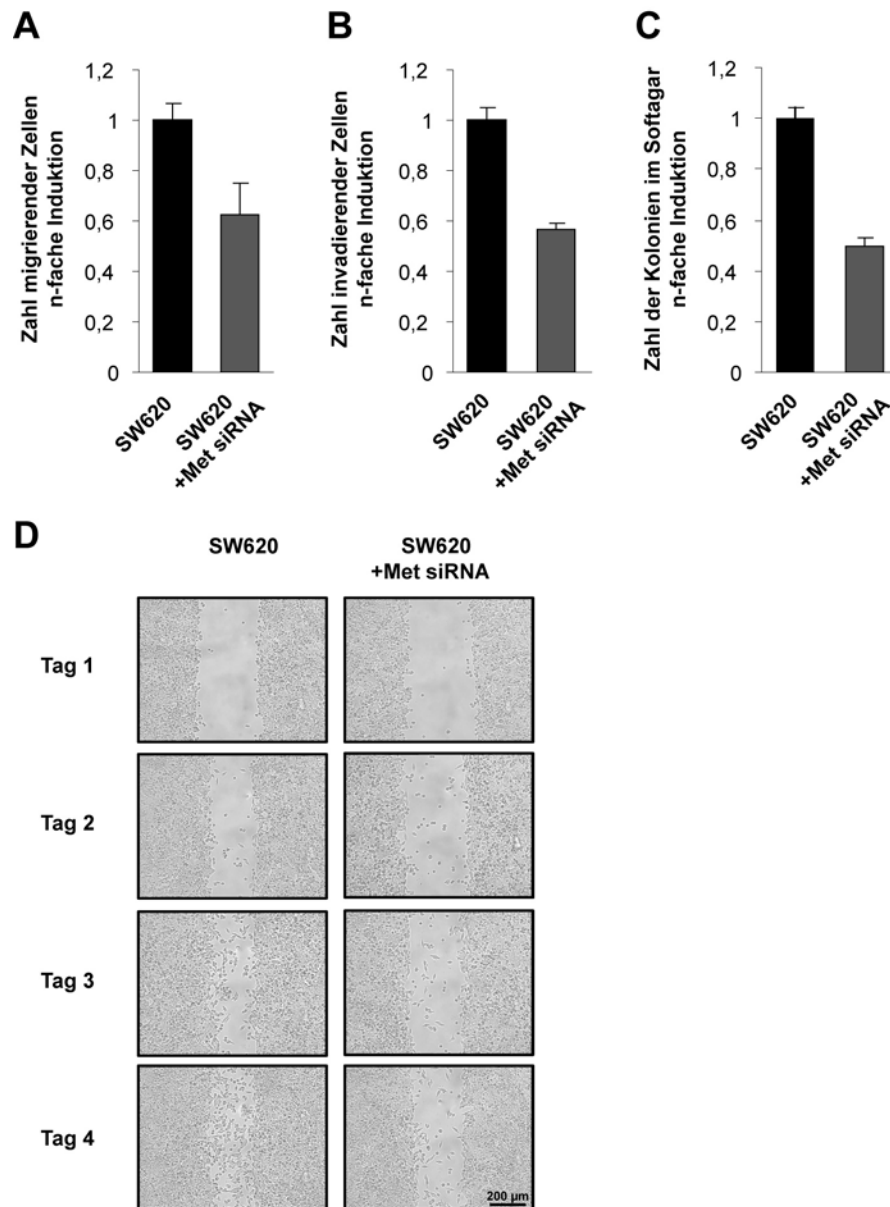


**Abb. 3.18: MACC1 reguliert die Met Expression in der endogen exprimierenden Kolonkarzinomlinie SW620.**

MACC1-, bzw. Met siRNA transfizierte Zellen wurden mittels qRT-PCR und Western Blot hinsichtlich ihrer Met-Expression analysiert. Das hohe intrinsische Met-Expressionsniveau wurde sowohl durch MACC1-, als auch durch Met siRNA deutlich reduziert.

SW620 Zellen zeigen in Korrelation zu ihrem starken MACC1 Level ein hohes Met-Expressionsniveau. Sowohl MACC1-, als auch Met siRNA-Behandlung führten zu einer starken Verminderung der Met-Expression. Demnach wird auch in diesem endogenen Expressionssystem der HGF-Rezeptor Met durch MACC1 reguliert.

Im Anschluss wurde untersucht, ob es sich auch in diesem Zellmodell um eine MACC1 induzierte, Met vermittelte Regulation des zellulären Verhaltens handelt. Hierzu wurden die Zellen mit Met siRNA transfiziert und analog 3.6.2 in den biologischen Assays analysiert. Die intrinsisch hohen Raten migrierender, invadierender und adhäsionsfrei proliferierender SW620 Zellen ließen sich durch Met siRNA stark reduzieren (Abb. 3.19). Im Wundheilungsassay zeigten Met siRNA-Transfektanten eine signifikante Reduktion der gerichteten Migration. Dies korreliert mit den unter 3.3 beschriebenen Ergebnissen nach MACC1 siRNA-Transfektion. Demnach werden auch in endogenen MACC1-exprimierenden Zellen die hier untersuchten biologischen Parameter durch eine MACC1-gesteuerte Met-Expression reguliert.



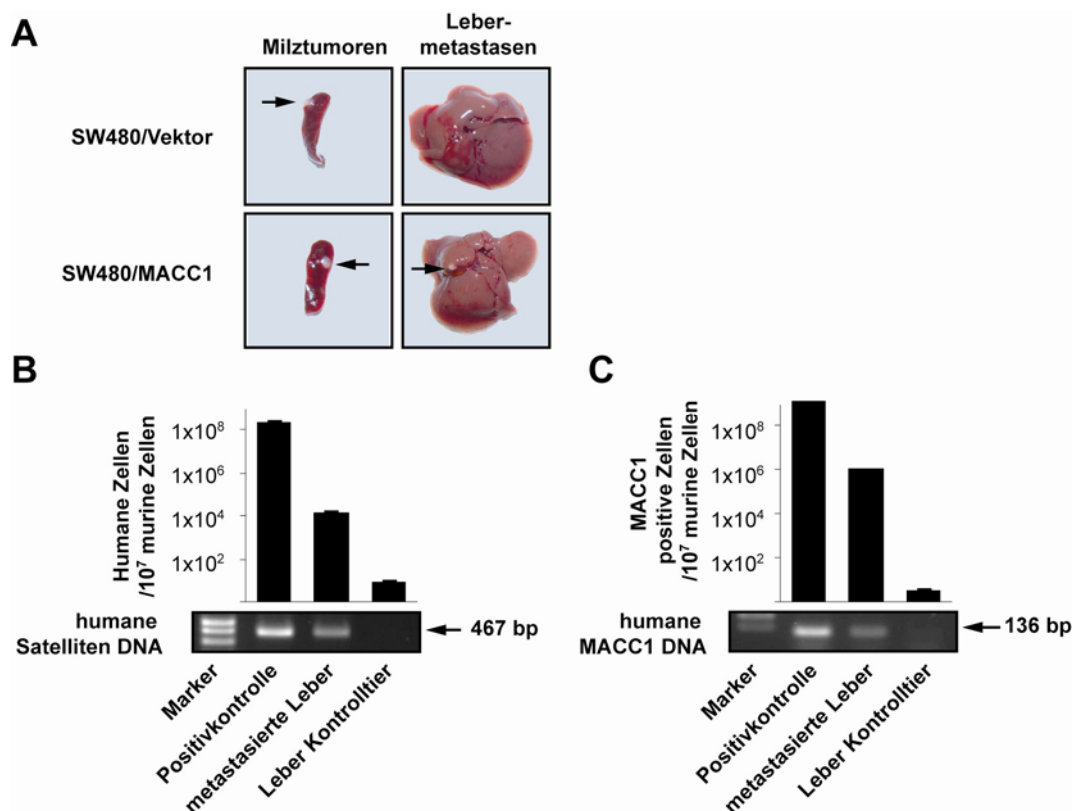
**Abb. 3.19: Auch in endogen MACC1 exprimierenden Zellen sind die MACC1 induzierten biologischen Effekte abhängig von der Met-Expression.**

Migration (A), Invasion (B), Koloniebildung (C) und Wundheilung (D) in Met siRNA-transfizierten SW620 Zellen. Met siRNA reduzierte die Zahlen migrierender, invadierender und adhäsionsfrei proliferierender Zellen auf bis zu 50%. Die gerichtete Migration der Zellen im Wundheilungsassay wurde durch Met siRNA ebenfalls deutlich vermindert.

### 3.8 MACC1 induziert die Metastasierung im *in vivo* Modell

#### 3.8.1 Metastasierung stabiler SW480/MACC1-Transfektanten

Um in einem ersten *in vivo* Modell das metastatische Potential MACC1 exprimierender Zellen zu analysieren, wurden die stabilen Transfektanten intrasplenal in NMRI nu/nu Mäuse transplantiert. 60 Tage nach Inokulation wurden den Tieren die Tumore entnommen und die Leber auf Metastasen hin untersucht (Abb. 3.20). Pro Gruppe wurden 6 Tiere analysiert. Alle *in vivo* Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der AG Experimentelle Pharmakologie und Onkologie am MDC (Frau Dr. I. Fichtner) durchgeführt.



**Abb. 3.20: MACC1 induziert die Metastasierung im intrasplenalen Mausmodell.**

1x10<sup>7</sup> SW480/Vektor- oder SW480/MACC1-Zellen wurden in die Milz von NMRI nu/nu Tieren transplantiert und nach 60 Tagen die Metastasierung in die Leber untersucht. SW480/MACC1-transplantierte Tiere zeigten geringe Zahlen makroskopisch nachweisbarer Metastasen (A). In Lebern SW480/MACC1- jedoch nicht SW480/Vektor-transplantierte Tiere wurde mittels PCR sowohl humane Satelliten DNA (B), als auch humane MACC1 DNA (C) nachgewiesen.

Beide Tiergruppen trugen Tumore vergleichbarer Größe an der Milz. In den Kontrolltieren war keine Lebermetastasierung nachweisbar. SW480/MACC1 transplantierte Tiere zeigten dagegen geringe Zahlen makroskopisch sichtbarer Lebermetastasen (Abb. 3.20A). Um potentiell vorhandene weitere Metastasen

nachzuweisen, wurden mittels PCR humane Zellen im Lebergewebe der Maus detektiert. Hierzu wurden Schnittserien des Lebergewebes angefertigt und die genomische DNA isoliert. In einer anschließenden PCR wurden humane Satelliten DNA und humane MACC1 DNA amplifiziert. Diese Methode ermöglicht auch den Nachweis von Mikrometastasen.<sup>161</sup>

Mittels Titration humaner Zellen (HCT 116) in murine Zellen (P 388) wurde zudem eine Eichkurve erstellt die in der quantitativen PCR die Kalibrierung der Zahl detektierter humaner Zellen ermöglichte. Abbildung 3.20 zeigt sowohl für humane Satelliten DNA (B) als auch für MACC1 DNA (C) ein deutliches Signal in den metastasierten Lebern SW480/MACC1-transplantierte Tiere. In den Kontrolltieren war dagegen keine humane DNA amplifizierbar. Somit konnten eindeutig humane Zellen und somit Metastasen in den Lebern der nachgewiesen werden.

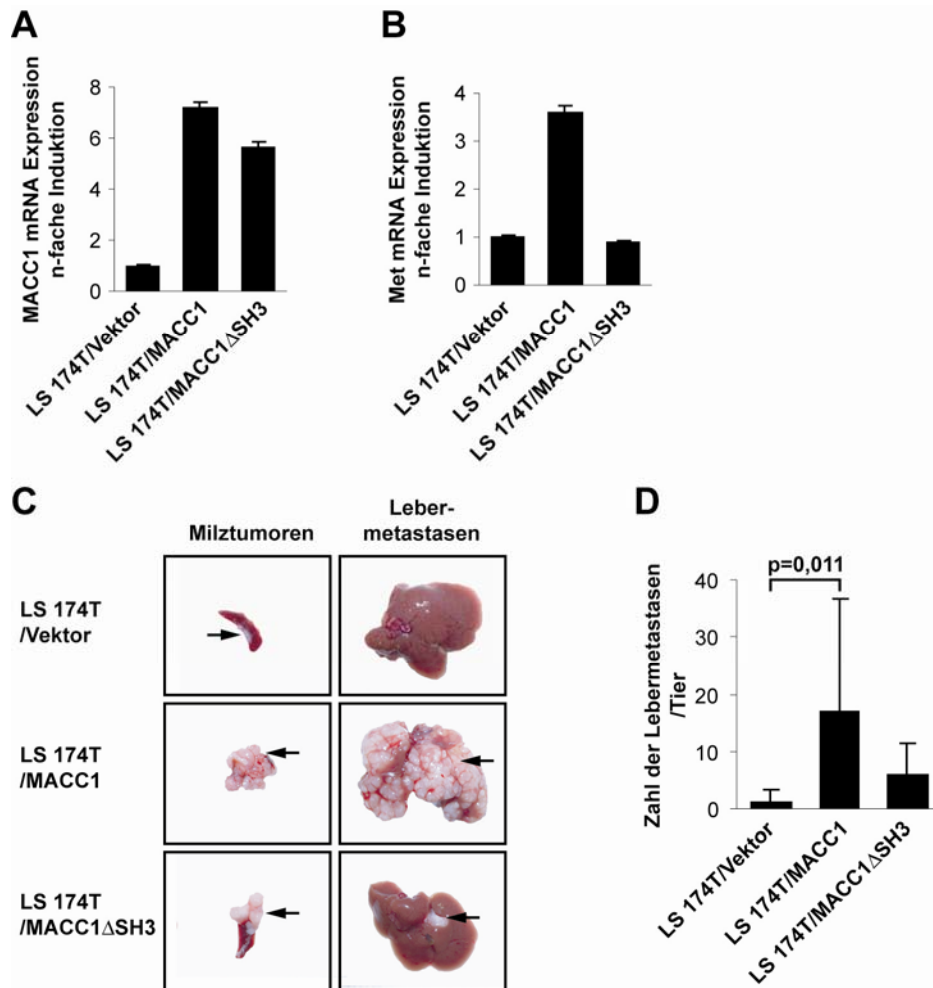
### 3.8.2 Metastasierung stabiler LS 174T/MACC1-Transfektanten

SW480/MACC1 transplantierte Tiere zeigten nur geringe Zahlen kleiner Lebermetastasen. Deshalb wurde das MACC1-Metastasierungspotential in einem alternativen Zelllinienmodell getestet. Hierfür wurden stabile Transfektanten der Kolonkarzinomlinie LS 174T mit dem Kontrollvektor, MACC1 und MACC1 $\Delta$ SH3 etabliert. Die Zellen wurden entsprechend dem SW480-Zellmodell in die Milz der Tiere inokuliert und die Metastasierung in die Leber analysiert.

Abbildung 3.21A/B zeigt zunächst die qRT-PCR Expressionsanalyse der jeweiligen stabilen LS 174T-Transfektanten, die für die *in vivo* Analyse eingesetzt wurde. Analog dem SW480-Zelllinienmodell konnte in der MACC1-Transfektante, jedoch nicht in der Kontrolle und der Deletionsvariante, eine Erhöhung der Met-Expression nachgewiesen werden. Die Zellen dieser charakterisierten, stabilen Transfektanten wurden in die Milz von je 6 Tieren pro Gruppe inokuliert und nach 34 Tagen die Lebermetastasierung untersucht. LS 174T/MACC1-inokulierte Tiere zeigten eine extreme Induktion der Lebermetastasierung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 3.21C). Die Lebern der Tiere waren vollständig mit Metastasen bedeckt. Außerdem waren in dieser Tiergruppe deutlich größere Tumore an der Milz zu verzeichnen. Die Quantifizierung der Lebermetastasen erbrachte eine signifikante Erhöhung der Metastasenzahl um das 15fache, verglichen mit der Vektorkontrollgruppe (Abb. 3.21D).

Um zusätzlich die Rolle der MACC1 Domänenstruktur in der *in vivo* Metastasierung zu erfassen, wurden parallel Tiere mit stabilen LS 174T/MACC1 $\Delta$ SH3 inokuliert. Diese Tiergruppe zeigte nur geringe Metastasenzahlen. Dies erhärtet die Daten aus den *in vitro* Analysen denen entsprechend die Domänenstruktur eine essentielle Bedeutung für die Funktion des MACC1-Proteins trägt.





**Abb. 3.21: Lebermetastasierung im LS 174T Mausmodell.**

(A,B) Es wurden stabile Kontrollvektor-, MACC1- und MACC1 $\Delta$ SH3-Transfektanten der Zelllinie LS 174T generiert. Die Klone wurden mittels qRT-PCR auf ihre MACC1- und Met Expression hin charakterisiert (gezeigt wird jeweils der repräsentative Klon, der im Tier zur Anwendung kam).

(C)  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in die Milz der NOD/SCID Mäuse inokuliert und nach 34 Tagen die Metastasierung evaluiert. LS 174T/MACC1 transplantierte Tiere zeigten größere Tumoren an der Milz und eine stark erhöhte Metastasierungsrate. (D) Die quantitative Auswertung der Lebermetastasen erbrachte eine signifikante Erhöhung der Metastasenzahl in LS 174T/MACC1 transplantierten Tieren um das 15fache. LS 174T/MACC1 $\Delta$ SH3-transplantierte Tiere zeigten dagegen nur geringfügig erhöhte Metastasierungsraten.

### 3.9 MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms

MACC1 wurde identifiziert als ein in Normalgewebe und metastasierenden Kolonkarzinomen differenziell exprimiertes Gen. Um zu klären, in welchem Stadium der Tumorprogression diese Erhöhung der MACC1 Expression eintritt, wurde der MACC1-Status in normaler Kolonmucosa, Adenomen und Karzinomen von Tumorpatienten untersucht. Abschließend wurde die Relevanz

von MACC1 für eine klinische Anwendung als prognostischer, molekularer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms evaluiert.

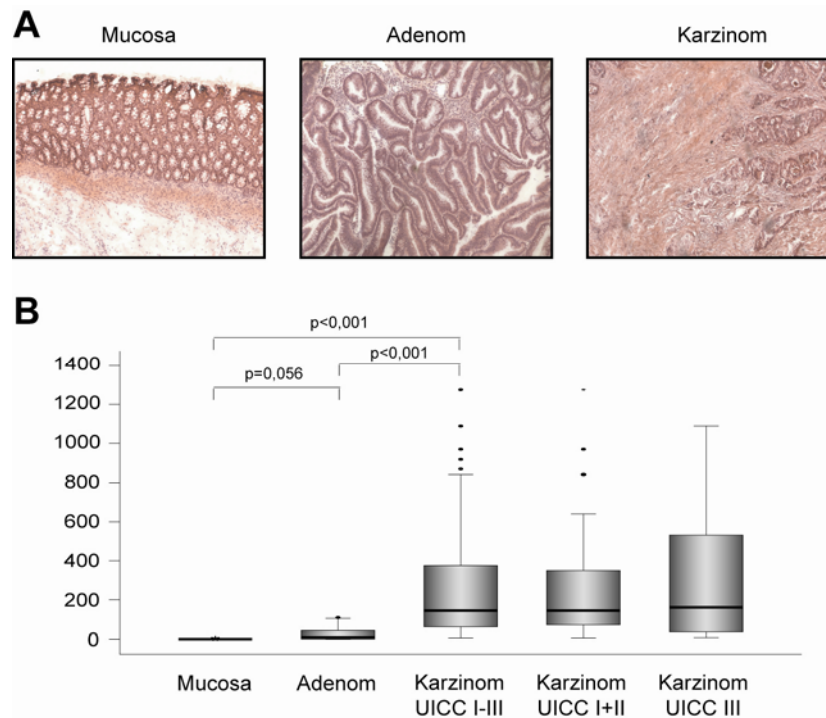
Für diese retrospektiven Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der Tumorbank der Robert-Rössle Klinik (Universitätsmedizin Berlin, CCB) rezidiertes Gewebe von 60 Kolonkarzinom- und 13 Adenom-Patienten, sowie korrespondierendes Normalgewebe (Mucosa) von 15 Patienten ausgewählt. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Tumoresektion keine Metastasen entwickelt – das heißt es lag bei keinem Patienten eine synchrone Metastasierung vor. Zusätzlich wurde abgesichert, dass die in die Analyse aufgenommenen Patienten nicht an einer hereditären Tumorerkrankung litten oder während der Nachbeobachtungszeit ein Zweitkarzinom entwickelt hatten. Eine Übersicht über die analysierten Gewebe findet sich im Anhang.

Von allen Gewebeproben wurden serielle Schnitte angefertigt, nach Evaluierung durch einen Pathologen (Dr. W. Haensch, RRK) entsprechend der an den Musterschnitten vorgenommenen Kennzeichnung die Tumorzellareale präpariert und RNA isoliert. Die MACC1-Expressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR.

### **3.9.1 MACC1-Expression in der Tumorprogression**

Um genauere Aussagen über den MACC1-Expressionsstatus im Verlauf der Tumorprogression treffen zu können, wurde MACC1 mRNA in normaler Mucosa des Kolons, in Adenomen und in Karzinomen mittels qRT-PCR quantifiziert.

Die untersuchten Normalgewebe zeigten nur ein basales MACC1 Expressionsniveau (Median: 0,21). In den analysierten Adenomen, einer benignen Vorstufe des Karzinoms, war eine leicht erhöhte MACC1-Expression nachweisbar. Das Expressionslevel unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Expression im Normalgewebe (Median: 9,00). Im Vergleich zu den Adenomen war in den analysierten Karzinomen der UICC Stadien I-III der MACC1-Status nochmals um das 16fache erhöht (Median: 144,37) (Abb. 3.22). Zwischen den Tumoren der frühen UICC Stadien I+II und dem fortgeschrittenen Stadium III konnte dagegen kein Unterschied im MACC1-Expressionsniveau nachgewiesen werden.



**Abb. 3.22: Deregulierte MACC1-Expression in der Tumorprogression.**

A) Exemplarische Darstellung normaler Mucosa des Dickdarms mit Krypten (Tunica mucosa), der angrenzenden Lamina muscularis mucosae und dem darunter liegenden lockeren Bindegewebe (Tunica submucosa) und im Vergleich dazu die zunehmend dedifferenzierte Gewebestruktur des Adenoms und des Karzinoms.

B) Box-Plots der mittels qRT-PCR ermittelten MACC1-Expression in den angegebenen Geweben. Die analysierten Karzinome (UICC I-III) zeigten eine signifikant höhere MACC1 Expression als Mucosa und Adenome. Zwischen den frühen (I+II) und fortgeschrittenen (III) UICC Stadien war jedoch kein Expressionsunterschied nachweisbar. Ermittelte Mediane MACC1 Expression in den einzelnen Entitäten: Mucosa: 0,21; Adenom: 9,00; Karzinom UICC I-III: 144,37; UICC I+II: 144,37; UICC III: 160,69

### 3.9.2 MACC1 ist ein neu identifizierter, unabhängiger, prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms

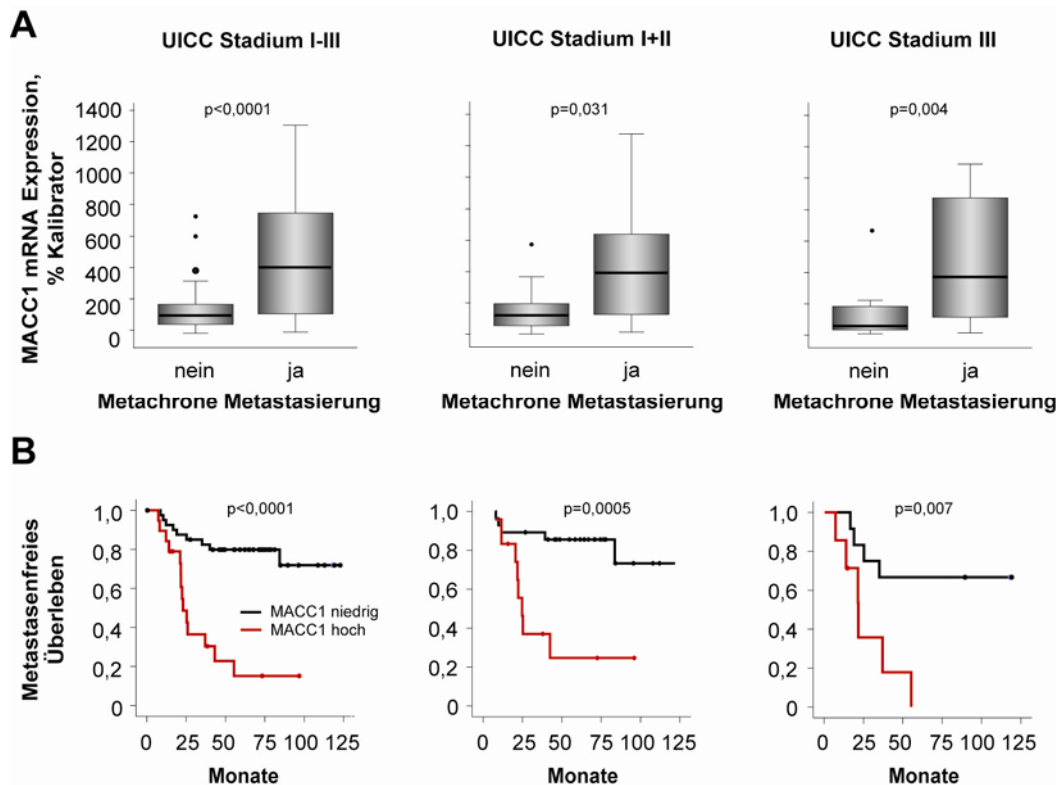
Von den 60 analysierten Kolonkarzinompatienten entwickelten 23 während der Nachbeobachtungszeit metachrone Metastasen. Diese Patienten wiesen im Vergleich zur metastasenfreien Patientengruppe eine signifikant erhöhte MACC1-Expression auf (Abb. 3.23A.) Im metastasierenden Primärtumor betrug die mediane MACC1-Expression 392,78, im nicht metastasierenden Tumorgewebe dagegen nur 115,31. Diese Differenzierung war nicht nur in der die UICC Stadien I-III zusammenfassenden Analyse möglich, sondern zeigte sich auch in der Einzelanalyse der frühen Tumorstadien I+II und des fortgeschrittenen Stadiums III.

Um den prognostischen Wert der MACC1 Expression im Primärtumor in Hinsicht auf die Metastasierungswahrscheinlichkeit zu analysieren wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt.<sup>170</sup>

Hierzu wurde zunächst mittels ROC-Analyse ein Grenzwert (cut-off) der MACC1 Expression zur Unterscheidung zweier Risikogruppen definiert. Patienten mit einer MACC1-Expression  $<240$  wurden als niedrig exprimierend, Patienten mit einer MACC1-Expression  $\geq 240$  dagegen als hoch exprimierend eingestuft. Die Wahrscheinlichkeit des metastasenfreien Überlebens dieser zwei Patientengruppen wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode berechnet. Diese Analyse ermöglicht die Kalkulation der Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb eines definierten Zeitintervalls.

Das MACC1-Expressionsniveau im Primärtumor erwies sich als signifikant prognostischer Marker für das metastasenfreie Überleben des Patienten. Patienten mit hoher MACC1-Expression zeigten im Vergleich mit der niedrig exprimierenden Patientengruppe eine deutlich verkürzte metastasenfreie Überlebenszeit (Abb. 3.23B). In der Gesamtanalyse (Patienten UICC Stadien I-III) lag die 5-Jahres-Überlebensrate hoch exprimierender Patienten bei nur 15%. Niedrig exprimierende Patienten zeigten dagegen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80%. Diese Korrelation konnte auch in der Einzelanalyse der frühen (UICC I+II) und späten (UICC III) Tumorstadien gezeigt werden. Die 5-Jahres-Überlebensraten lagen für die niedrig exprimierenden Patienten der frühen Stadien bei 86%, für die hoch exprimierenden Patienten dagegen bei nur 25%. Patienten mit niedrig exprimierenden Tumoren fortgeschrittener Stadien hatten 5-Jahres-Überlebensraten von 67%. Die hoch exprimierenden Patienten dieses Stadiums waren dagegen zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig verstorben. Hohe MACC1-Expression korreliert demnach in allen untersuchten Tumorstadien mit einer hohen Metastasierungswahrscheinlichkeit.

Die Unabhängigkeit des prognostischen Faktors MACC1 von anderen etablierten Markern wurde mit Hilfe der Logistischen Regression ( $p=0,002$ ) und der Cox-Regression ( $p=0,001$ ) evaluiert. Die Prognose des metastasenfreien Überlebens durch MACC1 ist unabhängig vom Alter und Geschlecht des Patienten, von der Tumorinfiltration, vom Nodalstatus und der Invasion in die Lymphgefäße. Somit ist MACC1 ein neuer, unabhängiger molekularer Marker für die Prognose des metastasenfreien Überlebens von Kolonkarzinom-Patienten.



**Abb. 3.23: Die MACC1 Expression im Primärtumor ist ein prognostischer Marker für das metastasenfreie Überleben des Patienten.**

In 60 primären Kolonkarzinomen der UICC Stadien I-III (nicht metastasiert zum Zeitpunkt der Resektion) wurde mittels qRT-PCR die MACC1-Expression bestimmt. Durch ROC-Analyse wurde ein cut-off Wert zur Differenzierung einer hoch- und einer niedrig exprimierenden Patientengruppe definiert (MACC1 niedrig:  $\text{MACC1} < 240$ ; MACC1 hoch:  $\text{MACC1} \geq 240$ ). 23 der 60 untersuchten Patienten entwickelten im Verlauf der Nachbeobachtungszeit distante Metastasen, 37 Patienten blieben metastasenfrei. (A) Box-Plots der MACC1 mRNA Expression in metastasenfreien vs. metachron metastasierten Primärtumoren. Sowohl in der Gesamtanalyse aller Patienten, als auch in der Einzelanalyse der frühen (UICC I+II) und der fortgeschrittenen (UICC III) Stadien ist eine signifikant höhere MACC1-Expression in den metastasierten Tumoren nachweisbar [UICC Stadien I-III (Median nicht metastasiert: 115,31; Median metastasiert: 392,78); UICC Stadien I+II (Median nicht metastasiert: 128,3; Median metastasiert: 392,78); UICC Stadium III (Median nicht metastasiert: 58,26; Median metastasiert: 371,58)].

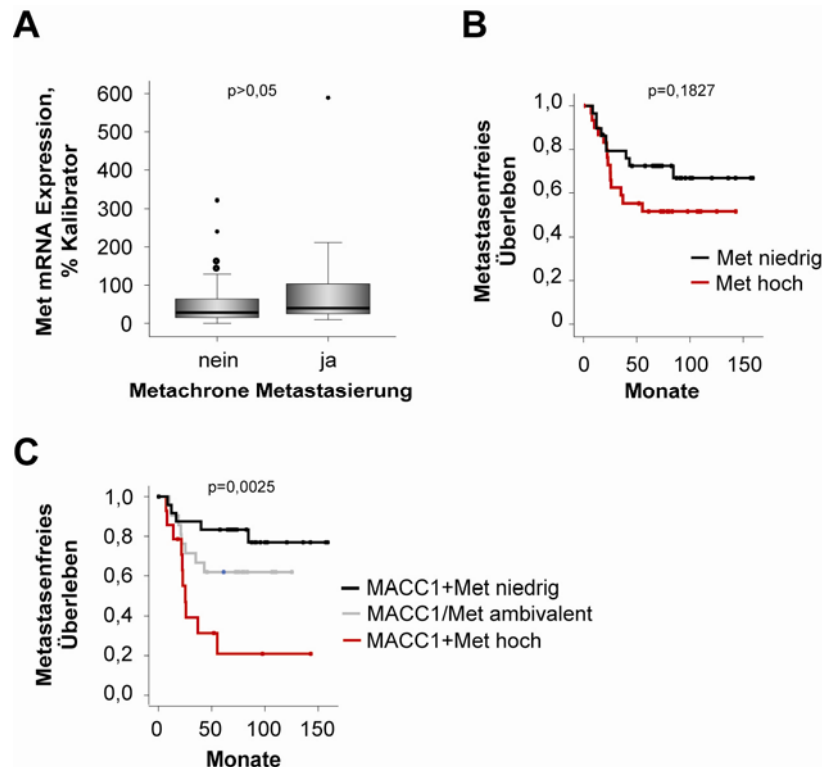
(B) Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse der hoch und niedrig MACC1-exprimierenden Patientengruppen. Sowohl in der Gesamtanalyse (UICC I-III), als auch in den Einzelanalysen (I+II, III) zeigten MACC1 hoch exprimierende Patienten ein signifikant schlechteres metastasenfreies Überleben als die niedrig exprimierende Patientengruppe. Folgende Wahrscheinlichkeiten für ein metastasenfreies 5-Jahres-Überleben wurden berechnet: UICC I-III: MACC1 niedrig: 80%, MACC1 hoch: 15%; UICC I+II: MACC1 niedrig: 86%, MACC1 hoch: 25%, UICC III: MACC1 niedrig: 67%, MACC1 hoch: 0%

### 3.9.3 MACC1 ist ein besserer Prognosefaktor als Met

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MACC1 die Expression des HGF-Rezeptors Met positiv reguliert. Die Met-Überexpression in Tumoren wurde bereits mit dem Progressionsstadium und einer schlechten Prognose assoziiert. Im Folgenden wurde die prognostische Relevanz der Met-Expression anhand des für die MACC1-Analyse genutzten Patientenkollektivs untersucht. Analog der MACC1-Analyse wurde mittels qRT-PCR die Met-Expression in den Tumoren bestimmt. Der Median der ermittelten Werte diente als cut-off Wert zur Differenzierung einer niedrig- und einer hoch Met-exprimierenden Patientengruppe (Met niedrig: Met<34; Met hoch: Met≥34). In einer kombinierten Überlebenszeitanalyse wurden die Daten beider prognostischer Gene auf die Fragestellung hin ausgewertet, ob eine Kombination der beiden Marker MACC1 und Met die Qualität der Prognose hinsichtlich des metastasenfreien Überlebens verbessert.

Metachron metastasierte Patienten der UICC Stadien I-III zeigten eine höhere Met-Expression (Median: 39,7) als nicht metastasierte Patienten (Median: 28,2) (Abb. 3.24A). Der Unterschied war jedoch bei weitem nicht so deutlich wie in der MACC1 Analyse und zeigte keine Signifikanz. Die Berechnung der metastasenfreien Überlebenswahrscheinlichkeit für die UICC Stadien I-III zeigte ähnliche Ergebnisse: Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in der hoch Met exprimierenden Patientengruppe bei 72%, in der niedrig Met exprimierenden Gruppe bei 52%. Ebenso wie MACC1 führt also eine erhöhte Met Expression zu einer verkürzten metastasenfreien Überlebenszeit. Die Prognose durch Met ist jedoch keinesfalls so stringent wie die MACC1 Prognose und bei weitem nicht signifikant (Abb. 3.24B).

In einer MACC1 und Met kombinierenden Überlebenszeitanalyse wurde untersucht, ob die Berücksichtigung beider Marker zu einer Verbesserung der Metastasierungsprognose führt (Abb. 3.24C). 25 der 60 Patienten zeigten sowohl niedrige MACC1, als auch niedrige Met Expression. In 14 der 60 Patienten waren beide Marker hoch exprimiert. Die restlichen 21 Patienten wurden der ambivalenten Gruppe zugeordnet in der einer der beiden Marker hoch, der andere niedrig exprimiert war. Die Wahrscheinlichkeit des metastasenfreien 5-Jahres-Überlebens lag für die MACC1+Met niedrig exprimierende Gruppe bei 83%, für die beide Gene hoch exprimierende Gruppe bei 21% und für die ambivalente Gruppe bei 62%. Die Signifikanz dieser kombinierten Überlebenszeitanalyse ist zwar erheblich besser als die der Met Einzelanalyse, erreicht jedoch nicht die Stringenz der MACC1-Prognose. Die Hinzunahme von Met als Metastasierungsmarker brachte demnach keine Verbesserung der durch MACC1 ermittelten Prognose der Wahrscheinlichkeit metastasenfreien Überlebens.



**Abb. 3.24: MACC1 ist ein besserer prognostischer Marker als Met.**

Analog der MACC1- Expressionsanalyse wurde in dem identischen Patientenkontingent (UICC Stadien I-III) die Met-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Mit Hilfe des Medians wurden eine niedrig und eine hoch Met-exprimierende Patientengruppe definiert.

(A,B) Box-Plots und Überlebenszeitanalyse der Met-Expression in Kolonkarzinom-Patienten. Metachron metastasierende Tumoren zeigten eine nicht signifikant höhere Met-Expression als nicht metastasierende Tumoren (Median nicht metastasiert: 28,19; Median metastasiert: 39,7). In der Überlebenszeitanalyse wurde für die niedrig exprimierende Patientengruppe eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 72%, für die hoch exprimierende Gruppe eine Wahrscheinlichkeit von 52% ermittelt. Auch diese Berechnungen waren nicht signifikant.

(C) Kombinierte Überlebenszeitanalyse der beiden Marker MACC1 und Met. Patienten, die beide Marker niedrig exprimierten zeigten ein signifikant besseres 5-Jahres-Überleben (83%), als MACC1 und Met hoch exprimierende Patienten (21%). 21 der 60 Patienten wiesen eine ambivalente Expression der beiden Marker auf. Für diese Gruppe lag das 5-Jahres-Überleben bei 62%. Die Kombination der beiden Marker ermöglicht, verglichen mit den MACC1-Analyse, keine verbesserte Aussage zur Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten.

## 4 DISKUSSION

Das Kolonkarzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Die erfolgreiche Behandlung der Patienten wird limitiert durch das Auftreten von Fernmetastasen des Primärtumors. Betroffene Patienten zeigen sehr geringe 5-Jahres-Überlebensraten. Eine frühzeitige Prognose der Metastasierungswahrscheinlichkeit, z.B. mit Hilfe molekularer Marker, würde eine individuelle Therapieplanung für Hochrisiko-Patienten ermöglichen.

MACC1 wurde neu isoliert als ein in primären Kolonkarzinomen und deren distanten Metastasen überexprimiertes Gen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MACC1 die Motilität, Invasivität und Proliferation von Tumorzellen induziert. MACC1 vermittelt diese zellulären Mechanismen über Interaktion mit dem HGF/Met-Signalweg. Es wurde nachgewiesen, dass der HGF-Rezeptor Met ein transkriptionelles Zielgen von MACC1 ist. MACC1 aktiviert die Met-Überexpression und induziert somit den metastatischen Phänotyp. Patientenanalysen ergaben eine direkte Korrelation der MACC1-Expression im Primärtumor mit der metachronen Metastasierung und dem metastasenfreien Überleben. MACC1 ist demnach ein neues Kandidatengen als molekularer, prognostischer Marker für die Metastasierung des Kolonkarzinoms.

### 4.1 MACC1 ist ein neu identifiziertes Protein mit Funktion in der Signaltransduktion

Bioinformatische Analysen der MACC1-Sequenz lieferten erste Hinweise auf die putative Funktion des neu identifizierten Proteins. Es wurden eine Reihe regulatorischer Domänen mit Funktion in der Protein-Protein-Interaktion identifiziert: eine SH3-Domäne, eine Prolin-reiche Sequenz (PXXP) und drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen.

SH3-Domänen sind ein weit verbreitetes Motiv in der Rezeptor-Tyrosinkinase-Signaltransduktion. So vermitteln z.B. Adaptermoleküle wie Grb2, aber auch eine Reihe von Kinasen wie Src und Abl und verschiedene Proteine der MAPK-Signalwege die zelluläre Antwort aktivierter Wachstumsfaktor-Rezeptoren über ihre SH3-Domänen.<sup>105,143,171</sup> Die Protein-Protein-Interaktion erfolgt durch Bindung der SH3-Domäne an das Prolin-reiche Motiv PXXP des Bindungspartners. Die Interaktion dieser beiden Domänen ermöglicht die Assemblierung großer interagierender Komplexe von Signalmolekülen.<sup>141,142</sup> Die MACC1-Domänenstruktur mit SH3-Domäne und PXXP-Strukturmotiv könnte also die bidirektionale Interaktion mit einem Bindungspartner oder auch die Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle zu einem Komplex vermitteln.

Neben diesen beiden Protein-Protein-Interaktionsdomänen wurden in MACC1 drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die Aktivierung von Signalmolekülen durch Phosphorylierung von Tyrosinen spielt eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion. So erfolgt z.B. die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Met über Autophosphorylierung regulatorischer Tyrosine. Phosphorylierte Tyrosinreste bilden Bindestellen für SH2-Domänen oder PTB-Domänen (Phosphotyrosin-Bindedomäne) enthaltende Kinasen oder Adaptermoleküle.<sup>172</sup>



MACC1 zeigt demnach eine Domänenstruktur, die kennzeichnend ist für Moleküle mit Funktion in Signaltransduktionskaskaden. Um die Funktionalität der identifizierten Domänen und ihre Rolle in einer möglichen MACC1-vermittelten zellulären Antwort zu untersuchen, wurden MACC1-Domänen-Mutanten ohne SH3- und/oder PXXP-Domäne generiert (MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup>, MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup>). Stabil mit diesen Domänen-Mutanten transfizierte Tumorzellen wurden in biologischen Assays auf Parameter wie Motilität und adhäsionsfreies Wachstum untersucht und mit Wildtyp-MACC1-Transfektanten verglichen.

Im Gegensatz zum Wildtyp-MACC1 zeigten die Domänen-Mutanten bei gleichem Expressionsniveau weder erhöhte Motilität und Invasivität, noch eine Induktion der Proliferation. Zusätzlich verhinderte die Deletion der Domänen die HGF-induzierte Translokation von MACC1 in den Zellkern und die Induktion der Met-Expression. Dies traf sowohl für die MACC1 $\Delta$ SH3- und MACC1PXXP<sup>mut</sup>-Einzelmutanten, als auch für die Doppelmutante MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> zu. Demnach führt bereits die Deletion eines der untersuchten Struktur motive zu einer vollständigen Deregulation der MACC1-Funktion. Sowohl die SH3-, als auch die PXXP-Domäne konnten somit als essentielle Struktur motive des funktionellen MACC1-Proteins bestätigt werden. Weiterführende Arbeiten in der AG Stein/Walther (C.Fleuter) konnten für die drei beschriebenen MACC1-Tyrosin-Phosphorylierungsstellen ebenfalls eine regulatorische Funktion nachweisen.

Die validierte Domänen-Struktur kennzeichnet MACC1 als Protein mit möglicher Funktion als Signalmolekül. Da MACC1 keine Kinase-Domäne aufweist, wird das Molekül vorrangig als Substrat von Tyrosinkinase n bzw. als Adapterprotein fungieren. Die drastischen Auswirkungen der Domänen deletion auf den Phänotyp der Zellen unterstreichen, dass die über die SH3- und PXXP-Motive vermittelte Protein-Protein-Interaktion entscheidende Bedeutung für die MACC1-Funktion hat. Neben den hier untersuchten Struktur motiven wurden mittels *in silico* Sequenzanalyse eine Reihe weiterer putativer Domänen identifiziert, z.B. Bindestellen für SH2-Domänen-tragende Liganden und EH-Domänen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MACC1 mittels seiner Domänen als Signalmolekül des HGF/Met-Signaltransduktionsweges agiert. MACC1-Überexpression führt zu einer Deregulation dieses Signalweges und induziert somit die Proliferation und das metastatische Potential von Tumorzellen. Die MACC1-Domänenstruktur ist kennzeichnend für nachgeschaltete Signalmoleküle von Rezeptor-Tyrosinkinase n, einer Rezeptorfamilie mit starker Implikation in Tumorigenese und Metastasierung.<sup>143,144</sup> MACC1 könnte also auch an der Signaltransduktion weiterer Rezeptor-Tyrosinkinase n beteiligt sein und somit Metastasierungs-assoziierte Prozesse wie Migration, Invasion und Proliferation regulieren.

## 4.2 MACC1 determiniert das metastatische Potential von Tumorzellen

### 4.2.1 MACC1 induziert Motilität, Invasivität und Proliferation

Die Überexpression von MACC1 in Primärtumoren und distanten Metastasen weist auf eine Funktion des Genes in der Tumorprogression und Metastasierung hin. Der Metastasierungsprozess ist assoziiert mit erhöhter Motilität, Invasivität und adhäsions-unabhängiger Proliferation der disseminierenden Tumorzellen. Um die zelluläre Funktion von MACC1 und die Auswirkungen der Überexpression auf die Eigenschaften der Tumorzelle zu analysieren, wurden stabile MACC1-Transfektanten der endogen niedrig-exprimierenden Zelllinie SW480 in biologischen Assays auf diese Metastasierungs-relevanten Parameter hin untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte MACC1-Expression zu einer Induktion der migratorischen und invasiven Kapazität von Tumorzellen führt. Zusätzlich zeigten die Zellen in Assoziation mit der MACC1-Expression eine stark erhöhte Proliferation.

Während des Metastasierungsprozesses lösen sich zunächst Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors und invadieren in das umliegende Gewebe und in nahe gelegene Blut- und Lymphgefäße.<sup>11,51</sup> Molekulare Grundlage für diese hohe Motilität bilden die alterierte Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E-Cadherin und verschiedenen Integrinen, und die Umgehung der Anoikis, dem programmierten Tod epithelialer Zellen bei Verlust des Zell-Zell-Kontaktes. Außerdem zeigen invasive Tumorzellen eine Reorganisation des Cytoskeletts und erhöhte Expression ECM-degradierender Proteinasen.<sup>6,43,61</sup> Einer der limitierenden Schritte des Metastasierungsprozesses ist die Proliferation der disseminierten Tumorzelle im Zielorgan. Voraussetzung hierfür ist die Interaktion der Tumorzelle mit den Zellen der angrenzenden Mikroumgebung, vor allem der Austausch von Wachstumssignalen. Das invasive Wachstum ist prinzipiell ein Charakteristikum mesenchymaler Zellen, wurde aber auch im Zusammenhang mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen beschrieben.<sup>127,168</sup> Die EMT maligner Zellen gilt als eine der Ursachen für die Tumordinvasion und Metastasierung.

Diese Arbeit zeigt, dass MACC1 zu den entscheidenden Faktoren gehört, die Motilität, Invasivität und Wachstum von Tumorzellen regulieren. Die Genspezifität der MACC1-induzierten Effekte wurde in allen Analysen mittels MACC1-spezifischer siRNA validiert. Um auszuschliessen, dass es sich bei den gezeigten phänotypischen Veränderungen um Effekte der exogenen MACC1-Überexpression handelt, wurden zusätzlich alle Analysen in einem intrinsisch hoch-exprimierenden Zelllinien-Modell durchgeführt: SW620 Zellen mit hohem MACC1-Expressionsniveau wurden mit MACC1 siRNA behandelt und auf Alterationen der migratorischen, invasiven und proliferativen Kapazität untersucht. Die siRNA-vermittelte Reduktion der MACC1-Expression führte auch in endogen exprimierenden Zellen zu einer Verminderung der Motilität, Invasivität und Proliferation und bestätigte somit die Rolle von MACC1 bei der Regulation dieser Metastasierungs-assoziierten Parameter.

Außerdem konnte sowohl in den MACC1-überexprimierenden SW480 Zellen, als auch in dem endogen exprimierenden Modell SW620 eine Induktion der Expression des HGF-Rezeptors Met durch MACC1 nachgewiesen werden. Dieser Befund unterstreicht die zentrale Funktion von MACC1 im Metastasierungsprozess, denn der HGF/Met-Signalweg ist entscheidend an der Regulation des metastatischen Potentials von Tumorzellen beteiligt.<sup>105</sup>

#### 4.2.2 MACC1 und die *in vivo* Metastasierung

Aufbauend auf den Ergebnissen der *in vitro* Analysen, die eine klare Korrelation der MACC1-Expression mit den invasiven und proliferativen Eigenschaften der Tumorzellen ergaben, wurde der Einfluss von MACC1 auf das metastatische Potential in zwei *in vivo* Modellen analysiert.

Vorhergehende *in vivo* Experimente konnten bereits ein erhöhtes, MACC1-korreliertes Tumorwachstum in subcutan- oder orthotop transplantierten Tieren nachweisen.<sup>134</sup> Zur Evaluierung des *in vivo* Metastasierungspotentials von MACC1 wurden zunächst MACC1-transfizierte SW480 Zellen intrasplenal transplantiert und die Tiere auf Lebermetastasierung untersucht. Bei diesem Ansatz handelt es sich um eines der klassischen *in vivo* Modelle zur Evaluierung der Metastisierungskapazität von Tumorzellen.<sup>173,174</sup> Im Gegensatz zu den metastasenfreien Kontrolltieren zeigten SW480/MACC1-transplantierte Tiere geringe Zahlen makroskopisch sichtbarer Lebermetastasen. Um diesen Befund zu validieren, wurden zusätzlich in den murinen Lebergeweben humane Satelliten-DNA bzw. humane MACC1-DNA und somit humane Zellen nachgewiesen. In den Lebern der Kontrolltiere fiel der Nachweis humaner Zellen negativ aus.

Um diesen Befund zu validieren, wurde ein alternatives Zelllinien-Modell für die *in vivo* Analyse etabliert: LS 174T ist eine Zelllinie mit höherem intrinsischen Metastisierungspotential als SW480 und wird häufig in *in vivo* Modellen eingesetzt.<sup>175</sup> Transplantierte LS 174T/MACC1-Zellen entwickelten größere Tumoren an den Milzen als die entsprechenden Kontrollen. Dies bestätigt die *in vitro* nachgewiesene Rolle von MACC1 als Induktor der Proliferation.<sup>176</sup> Neben einem erhöhten Tumolvolumen an der Milz zeigten LS 174T/MACC1 transplantierte Tiere eine signifikant erhöhte Metastisierungsrate. Die Lebern der Tiere waren vollständig mit makroskopisch gut sichtbaren Metastasen überzogen. Im Gegensatz hierzu waren in den Kontrolltieren nur sehr wenige Lebermetastasen nachweisbar. Die Deletion der SH3-Domäne in MACC1 führte zu einer weitgehenden Reduktion der Metastisierungsrate. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die MACC1-induzierte Metastisierung über Protein-Protein-Interaktion des Moleküls in Signaltransduktionskaskaden vermittelt wird. Eine Ursache für die MACC1-induzierte Metastisierung liegt mit grosser Wahrscheinlichkeit in der erhöhten Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase Met durch MACC1.

Die Tumorigenität des HGF/Met-Signalweges wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen analysiert. Die Überexpression von HGF und/oder Met führt in transplantierten, humanen Zelllinien zu erhöhtem Tumorwachstum in unterschiedlichen *in vivo* Modellen. Außerdem zeigen HGF/Met-überexprimierende Zellen sowohl nach intravenöser als auch nach subcutaner Applikation ein erhöhtes Metastisierungspotential.<sup>177-181</sup> Tiermodelle, die den

Rezeptor oder den Liganden als Transgen exprimieren, weisen anormales Wachstum, Tumorbildung in der Leber und erhöhte Metastasierungsraten auf.<sup>182-188</sup>

MACC1 aktiviert die Expression des HGF-Rezeptors Met und ist somit ein wichtiger Induktor der HGF/Met vermittelten Tumorigenese und Metastasierung. Die *in vivo* Daten bestätigen die bereits in den *in vitro* Analysen gezeigte Regulation Metastasierungs-relevanter zellulärer Eigenschaften wie Motilität, Invasion und Proliferation durch MACC1. Auch im Tiermodell ist MACC1 ein entscheidender Faktor für das metastatische Potential der Tumorzellen.

### 4.3 MACC1 und der HGF/Met-Signalweg

#### 4.3.1 MACC1 aktiviert den HGF/Met-Signalweg

Die MACC1-Domänenstruktur und die hohe Expression in Tumoren und Metastasen sind Indizien dafür, dass MACC1 mit Metastasierungs-assoziierten Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen interagiert. Deshalb wurden an den MACC1-Transfektanten verschiedene Wachstumsfaktoren mit Implikation in Tumorigenese und Metastasierung getestet.

Der Hepatocyte-growth-factor HGF ist der Ligand der Rezeptor-Tyrosinkinase Met. Der HGF/Met-Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Wachstum, Migration und Invasion von Tumorzellen. HGF- und/oder Met-Überexpression ist in vielen Tumorentitäten korreliert mit einer schlechten Prognose.<sup>105</sup> In den letzten Jahren wurde Met außerdem im Zusammenhang mit der epithelialen-mesenchymalen Transition beschrieben.<sup>127</sup>

Die EMT, ein essentieller Prozess in der Embryogenese, gilt heute als ein möglicher Mechanismus für die Tumorprogression und Metastasierung. Tumorzellen epithelialen Ursprungs entwickeln sich zu Zellen mesenchymalen Charakters mit verminderter Differenzierung, Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und hoher Motilität und Invasivität. Diese transitierten Zellen sind in der Lage, sich aus dem Zellverband des Tumors zu lösen und ins umliegende Gewebe zu invadieren. Diese Prozesse werden maßgeblich durch den HGF/Met-Signalweg gesteuert.<sup>189</sup>

Der Scatterassay ist ein Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die Motilität und EMT epithelialer Zellen. Er wird z.B. für die Analyse der HGF-stimulierten zellulären Antwort eingesetzt.<sup>105,190</sup>

MACC1-Transfektanten reagierten auf die HGF-Applikation mit stark erhöhter Motilität. Es kam zu einer Dispersion der kompakten epithelialen Zellkolonien mit vollständigem Verlust des Zell-Zell-Kontaktes und zur Ausbildung eines hochmotilen, Fibroblasten-artigen Phänotyps. Diese zellulären Veränderungen sind die typische Antwort epithelialer Zellen auf die Aktivierung des HGF/Met-Signalweges.<sup>105,113</sup> Mit Hilfe von MACC1 siRNA wurde geprüft, ob die gezeigten phänotypischen Effekte genspezifische Mechanismen der MACC1-Überexpression sind. Zusätzlich wurde Met siRNA eingesetzt, um sicherzustellen, dass tatsächlich eine Aktivierung der Met-vermittelten Signaltransduktion vorliegt. Die Applikation beider siRNAs führte zu einer fast vollständigen Inhibierung des mesenchymalen Phänotyps in MACC1-

Transfektanten. Somit konnte die durch MACC1 vermittelte Aktivierung des HGF/Met Signalweges bestätigt werden.

In den parental SW480 Zellen und den MACC1-Domänenmutanten MACC1 $\Delta$ SH3, MACC1PXXP<sup>mut</sup> und MACC1 $\Delta$ SH3PXXP<sup>mut</sup> war dagegen kein 'Scattern' der Zellen nachweisbar. Demnach führt MACC1 in Abhängigkeit seiner funktionellen Domänen durch Protein-Protein-Interaktion zu einer Aktivierung des HGF/Met-Signalweges in epithelialen Tumorzellen.

Eine Reihe von Proteinen der HGF/Met-Signalkaskade weisen Domänenstrukturen auf, die eine Interaktion mit MACC1 ermöglichen. SH3-Domänen wurden erstmals in der Tyrosinkinase Src beschrieben. Die Src interagiert mittels ihrer SH3-Domäne mit verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen, reguliert die Motilität und Proliferation und zeigt mit Progression des Kolonkarzinoms steigende Aktivität.<sup>139</sup> MACC1 könnte in ähnlicher Weise über seine SH3-Domäne an der Regulation des HGF/Met-Signalweges beteiligt sein. So trägt das Adaptermolekül Gab1, das für die Assemblierung des zentralen Signalkomplexes nach Aktivierung des Met-Rezeptors verantwortlich ist, Prolin-reiche Motive die eine Interaktion mit der SH3-Domäne von MACC1 ermöglichen.<sup>172</sup> Das PXXP-Motiv und die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen befähigen MACC1 zur potentiellen Interaktion mit einer Reihe von SH2/SH3-Domänen tragenden Proteinen des HGF/Met-Signalweges wie z.B. die Adapter Grb2, Shp2 und die PI3K.<sup>105,172</sup>

Die Analyse der HGF-abhängigen Proliferation ergab eine starke Induktion des Wachstums in MACC1-überexprimierenden Zellen durch HGF. Die Aktivierung des HGF/Met-Signalweges erfolgt demnach in Abhängigkeit von der Bindung des Liganden. Auch in Tumoren erfolgt die Induktion des HGF/Met-Signalweges häufig über Liganden-abhängige parakrine oder autokrine Aktivierung des Rezeptors.<sup>105,180</sup> Die erhöhte Proliferation wurde sowohl durch MACC1- als auch Met-spezifische siRNA teilweise revertiert. Dies validiert die bereits im Scatterassay gezeigte Aktivierung des HGF/Met-Signalweges durch MACC1.

#### 4.3.2 MACC1 interagiert mit HGF/Met-induzierten MAPK-Signalen

Der aktivierte Met-Rezeptor rekrutiert einen Signalkomplex aus Adaptermolekülen und Kinasen, die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden induzieren und somit die komplexe zelluläre Antwort nach HGF-Induktion vermitteln.<sup>105,191</sup> Der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg nehmen in der Regulation Metastasierungs-assoziiierter Parameter durch HGF eine Schlüsselrolle ein.<sup>192,193</sup> Der über die GTPase Ras vermittelte MAPK-Signalweg steuert vor allem Proliferation und Motilität.

Er induziert die Expression von Zellzyklus-Regulatoren und Matrix-degradierenden Proteinasen. Der PI3K-Signalweg reguliert über die Aktivierung der Kinase Akt vorrangig das Überleben der Zelle. Seine Aktivierung führt zur Inhibierung Apoptose-initiierender Proteine.<sup>105</sup>

Um eine mögliche Kooperation von MACC1 mit MAPK- oder PI3K-Signalen zu identifizieren, wurde die Wirkung von Inhibitoren dieser beiden Signalwege auf die MACC1-vermittelte EMT im Scatterassay analysiert. Zu diesem Zweck wurden die PI3K-Inhibitoren LY294002 bzw. Wortmannin und die MEK1/2-

Inhibitoren PD98059 bzw. UO126 eingesetzt. LY294002 und Wortmannin inhibieren die Phosphorylierung von Akt durch die PI3K. PD98059 bzw. UO126 inhibieren die Phosphorylierung der p44/42 MAPK durch MEK1/2. Die Phosphorylierung und dementsprechend die Aktivierung eines zentralen Signalmoleküls des Akt bzw. MAPK-Signalweges wird somit unterbunden.<sup>194,195</sup> Die Inhibierung des PI3K-Signalweges hatte keinen Einfluss auf die MACC1-vermittelte Motilität der Zellen. Der PI3K-Weg scheint also bei der MACC1-vermittelten HGF/Met-Antwort hinsichtlich Migration, Invasion und EMT nur eine untergeordnete Funktion einzunehmen. Die Applikation von Inhibitoren des MAPK-Signalweges führte dagegen zu einer vollständigen Revertierung des mesenchymalen Phänotyps in MACC1-Zellen: Auch nach HGF-Induktion zeigten die Zellen ein Wachstum in kompakten epithelialen Zellclustern. Demnach agiert MACC1 also vorrangig über den MAPK-Signalweg und vermittelt auf diese Weise die erhöhte Sensitivität gegenüber HGF und die verstärkte Signalantwort der Zellen.

Die zentrale Rolle des MAPK-Signalweges in der Vermittlung der EMT-induzierenden zellulären Prozesse wurde bereits in anderen Arbeiten bestätigt.<sup>192,196</sup> Das Adapterprotein Gab1 und die GTPase Ras haben eine entscheidende Funktion in der Aktivierung und Regulation des MAPK-Signalweges. Die deregulierte Expression oder Aktivierung dieser Moleküle führt zur Tumorprogression in *in vivo* Modellen und zu einem erhöhten metastatischen Potential von Tumorzellen.<sup>197,198</sup> Onkogenes Ras verstärkt das HGF/Met-induzierte Tumorstadium und die Metastasierung im Tiermodell. Die molekulare Ursache hierfür liegt in einer Sensitivierung der Zellen gegenüber den HGF-Signalen und einer anhaltenden Aktivierung des MAPK-Signalweges.<sup>192,199</sup> Zusätzlich ist Ras in der Lage durch Aktivierung von Ets/AP1 Transkriptionsfaktoren die Met-Expression zu induzieren.<sup>105,199,200</sup>

Eine ähnliche Funktion im HGF/Met-Signalweg kann ebenfalls für MACC1 angenommen werden: Die MACC1-Überexpression führt in Abhängigkeit des MAPK-Signalweges zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber HGF-Signalen und zur Ausprägung eines metastatischen Phänotyps.

Die Induktion des MAPK-Signalweges durch HGF führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Ets- und AP1-Familien. Diese interagieren an sogenannten Ras-responsive-elements (RRE) der Zielgen-Promotoren und induzieren z.B. die Expression von Proteinasen wie uPA und Collagenase 1, die die durch HGF induzierte Zellmotilität vermitteln.<sup>105,201,202</sup>

Außerdem steuert der HGF/Met-MAPK-Signalweg die Expression von Zellzyklus-Regulatoren wie Rb oder p27 und von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und Integrin  $\alpha_2$ .<sup>105,203,204</sup> Die Regulation von Adhäsionsmolekülen nimmt eine Schlüsselrolle in der HGF/Met-induzierten Transition der Zellen zum invasiven, metastatischen Phänotyp ein. Kürzlich konnte mittels Microarray-Technologie eine Vielzahl weiterer transkriptioneller Zielgene des HGF/Met-Signalweges identifiziert werden. Hierzu gehören z.B. HAT1 (Histone acetyltransferase 1) und API5 (Apoptosis inhibitor 5).<sup>205</sup> Der MAPK-Signalweg hat essentielle Funktion in der Vermittlung der HGF/Met-induzierten Motilität, Invasivität und Proliferation. Er induziert die transkriptionelle Aktivierung entsprechender Zielgene, wie Proteinasen, Zellzyklus-Modulatoren und

Adhäsionsmoleküle. Die Interaktion von MACC1 mit diesem Signalweg macht es zu einem wichtigen Regulator von Tumorigenese und Metastasierung.

Der Wachstumsfaktor HGF vermittelt die Progression zum invasiven Phänotyp über ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionskaskaden.<sup>114,116</sup> Neben der Beteiligung von MACC1 am MAPK-Signalweg ist also auch eine Interaktion des Proteins mit weiteren Signalkaskaden denkbar.

Der HGF-Rezeptor Met ist in der Lage mit membranständigen Rezeptoren zu assoziieren, welche die Zell-Zell/ Zell-Matrix-Adhäsion und Reorganisation des Cytoskeletts vermitteln. Hierzu gehören der Hyaluron-Rezeptor CD44, Integrin  $\alpha_6\beta_4$ , und E-Cadherin. Außerdem wurde eine Interaktion von Met mit dem Fas-Rezeptor und Semaphorin-Rezeptoren nachgewiesen.<sup>105,129,206,207</sup> Zusätzlich wechselwirkt der HGF/Met-Signalweg mit einer Vielzahl von Schlüssel molekülen anderer Signaltransduktionskaskaden wie Stat3, JNK, und NF- $\kappa$ B.<sup>208-211</sup> Der Notch-Signalweg inhibiert das Met-abhängige invasive Wachstum.<sup>120</sup> Dagegen führt die HGF-Induktion zu einer Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges: Tyrosin-phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin transloziert nach HGF-Applikation in den Zellkern und aktiviert dort, unabhängig von Wnt-Signalen, die Transkription von Zielgenen wie Cyclin D1 und c-Myc.<sup>212,213</sup> Zusätzlich ist  $\beta$ -Catenin in der Lage die Met-Expression zu induzieren. Die positive Interaktion dieser beiden Signalwege verstärkt das invasive Wachstum von Kolonkarzinom-Zellen.<sup>214</sup>

Das Zusammenwirken des HGF/Met-Signalweges mit weiteren Membran-Rezeptoren und Signaltransduktionswegen ermöglicht eine komplexe Modulation der HGF-vermittelten zellulären Prozesse. Für alle diese Moleküle wurde bereits in anderen Signalwegen eine Assoziation mit Tumorprogression und Metastasierung beschrieben. Ihre Interaktion mit dem HGF/Met-Signalweg zeigt, dass Tumorigenese und Metastasierung durch eine Vielzahl quervernetzter Signalkaskaden verursacht wird. Auch MACC1 könnte in diesem komplexen Netzwerk aus Signalmolekülen regulierend in weitere Signaltransduktionskaskaden eingreifen und Motilität, Invasivität und Proliferation der Tumorzellen steuern.

#### 4.3.3 MACC1 reguliert die Expression des HGF-Rezeptors Met

MACC1 erhöht die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber den Motilitäts- und Wachstums-induzierenden Signalen von HGF und führt so zu einer verstärkten Aktivität des HGF/Met-Signalweges. Dies belegen die Ergebnisse der HGF-abhängigen Scatterassays und Proliferationsanalysen, sowie die entsprechenden MACC1- und Met siRNA Experimente. Um die molekulare Funktion von MACC1 in der Regulation der HGF/Met-Signalkaskade zu untersuchen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation des Proteins analysiert: Die Aktivierung des HGF/Met-Signalweges durch Applikation des Liganden führte zur Translokation von MACC1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern. Dieses Ergebnis wirft die Frage nach einer möglichen Funktion von MACC1 als Transkriptions-Regulator auf.

Eine Ursache für die erhöhte Sensitivität von Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren und Cytokinen ist die alterierte Expression des entsprechenden Membran-Rezeptors. Um zu untersuchen, ob MACC1 als

Transkriptionsfaktor wirkt und über Interaktion mit dem Met-Promotor die Rezeptor-Expression steuert, wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Die MACC1-Überexpression führte zu einer 10fachen Erhöhung der Met-Promotor-Aktivität. Die für die MACC1-vermittelte Induktion essentiellen Bindemotive liegen im Sequenzbereich von -223 bis -68 bp des Met-Promotors. Die Interaktion von MACC1 mit diesem kurzen proximalen Promotorfragment zeigte bereits die maximal induzierbare Reporter-Gen-Expression. In den MACC1-Domänenmutanten war weder eine HGF-induzierte nukleäre Translokation noch eine Aktivierung der Met-Promotoraktivität nachweisbar. Das Ergebnis der Reporter-Gen-Studien wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation verifiziert. MACC1 interagiert auch mit dem endogenen -223 bis -68 bp-Fragment des Met-Promotors.

Die genomische Organisation des HGF-Rezeptors Met und seines Promotors wurden 1998 erstmals charakterisiert.<sup>145</sup> Der für die MACC1-Regulation entscheidende Sequenzbereich liegt in einem proximalen Met-Promotorabschnitt, in dem bereits eine AP2- und drei Sp1-Bindestellen identifiziert wurden.<sup>215</sup>

Der Transkriptionsfaktor AP2 bindet GC-reiche DNA-Sequenzen. Er hat entscheidende Funktionen in der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose. So vermittelt AP2 z.B. Wachstumsfaktor-induzierte Signale und interagiert mit dem  $\beta$ -Catenin-Signalweg.<sup>216,217</sup> Die transkriptionelle Aktivität des Proteins wird über eine Vielzahl von Bindungspartnern reguliert. Hierzu gehören YB1, p53, Sp1, Myc, Rb und APC. Verschiedene Arbeiten assoziierten AP2-Aktivität mit der malignen Transformation.<sup>216</sup>

Sp1 ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der die konstitutive Expression von Genen mit TATA-Box freiem Promotor (wie Met) reguliert. Sp1 bindet an sogenannte GC/GT-Boxen, GC-reiche Elemente mit der Konsensussequenz 5'(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)3'. Dieses Bindemotiv findet sich in einer Vielzahl humaner Gene.<sup>218</sup> Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wird über eine Reihe trans-aktivierender Elemente moduliert. So interagiert Sp1 mit anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren wie Sp3 und NF- $\kappa$ B. Daneben wurde die Protein-Protein-Interaktion von Sp1 mit einer Vielzahl anderer nukleärer Faktoren wie p53, Smad2/3/4, Rb, c-jun und AP2 nachgewiesen.<sup>218,219</sup> Studien zeigen, dass Sp1-Transkriptionsfaktoren eine kritische Rolle in Tumorentstehung und Metastasierung spielen. Die Sp1-Überexpression ist in diversen Tumorentitäten mit einer verschlechterten Prognose assoziiert.<sup>218</sup>

Die essentielle Funktion der im -223 bis -68 bp liegenden Met-Promotor Sp1-Motive für die konstitutive Expression des Rezeptors wurde bereits nachgewiesen.<sup>145</sup> Verschiedene Arbeiten zeigten eine transkriptionelle Regulation von Met durch Interaktion von Sp1 mit Sp3, Smads und Egr-1.<sup>220-222</sup>

In der MACC1-Sequenz wurde keine DNA-Bindedomäne identifiziert. Das Protein muss daher seine transkriptionelle Aktivität über Protein-Protein-Interaktion ausüben. Die gezeigte Bindung von MACC1 im -223→ -68 bp Abschnitt des Met-Promotors wird wahrscheinlich über die Interaktion mit einem der dort identifizierten DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren vermittelt. Sowohl AP2 als auch Sp1 modulieren ihre transkriptionelle Aktivität durch Bindung weiterer trans-aktivierender Elemente.<sup>216,218</sup> Es ist deshalb anzunehmen, dass

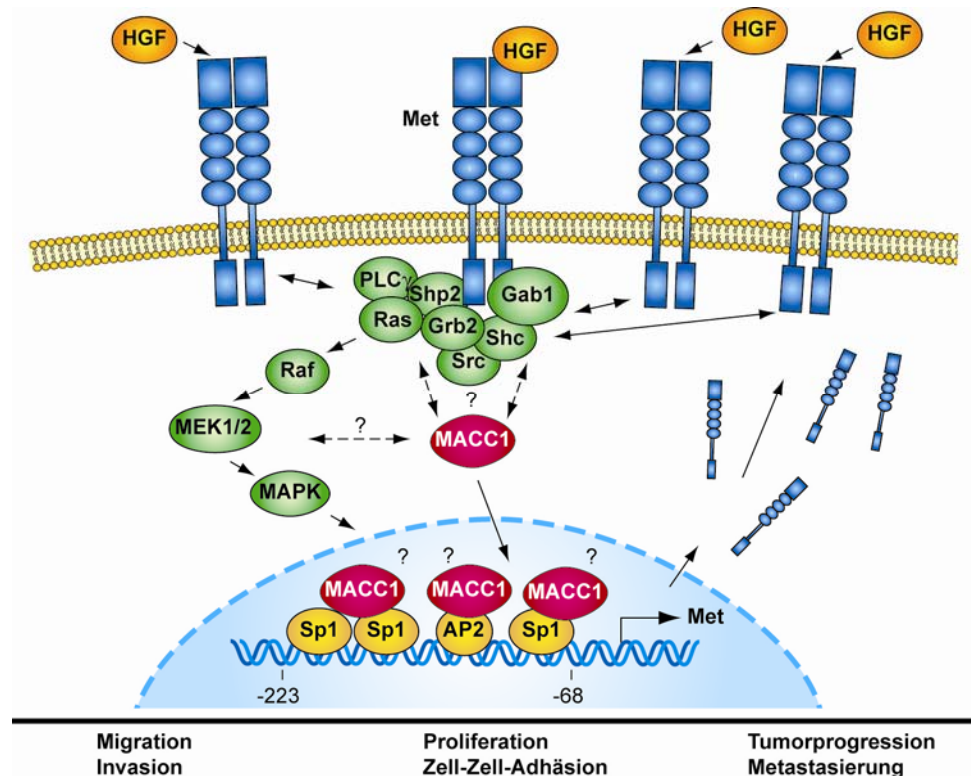


MACC1 die Met-Expression entweder durch direkte Bindung an einen der beiden Transkriptionsfaktoren oder durch Bildung eines größeren Signalkomplexes initiiert. Erste Reporter-Experimente mit Deletionen der AP2- und Sp1-Bindemotive im betreffenden Sequenzabschnitt des Met-Promotors weisen auf eine Interaktion von MACC1 mit dem Sp1-Transkriptionsfaktor hin. Diese Ergebnisse bedürfen jedoch noch der Validierung.

Der Met-Promotor weist außerhalb des -223→ -68 bp Abschnitts eine Reihe weiterer Sp1-, und AP2-Bindemotive auf.<sup>145</sup> Zusätzlich wurden Bindestellen für AP1, Myc, NF-κB und c/EBP identifiziert. Eine Vielzahl von Cytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren aktivieren die Met-Expression. Hierzu gehören z.B. IL-1, IL-6, TGF-β1 oder TNFα.<sup>223,224</sup> Sie induzieren die Met-Expression über Sp1, Stat3, Smad und NF-κB Transkriptionsfaktoren.<sup>221,225</sup> Auch Hypoxie, der häufig in Tumoren vorliegende akute Sauerstoffmangel aufgrund mangelnder Vaskularisierung des hochproliferativen Gewebes, führt zu erhöhter Expression des HGF-Rezeptors; in diesem Falle vermittelt über den Transkriptionsfaktor HIF-1α.<sup>226</sup> Boon et al. zeigten die Regulation der Met-Expression durch Wnt/β-Catenin induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF4.<sup>119</sup> Sie wiesen somit eine Quervernetzung zweier Signalkaskaden mit zentraler Bedeutung in Tumorigenese und Metastasierung nach.

Auch der eigene Ligand HGF reguliert die Expression des Rezeptors Met.<sup>227,228</sup> Die derzeitigen Daten weisen darauf hin, dass HGF über den Ras-Raf-vermittelten MAPK-Signalweg Sp1 und Ets/AP1 Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Met-Expression induzieren.<sup>201,228</sup> Deregulation dieser Signalkaskade, etwa durch onkogenes Ras, führt zu verstärkter Met-Expression und zu erhöhter Tumorigenität und Metastasierung in *in vivo*-Modellen.<sup>199,200,229</sup>

Mit MACC1 wurde ein weiterer transkriptionell aktiver Faktor identifiziert, der die HGF-induzierte Met-Expression vermittelt. Auf die Resultate der Promotoranalysen hin wurde die Expression des HGF-Rezeptors in MACC1 überexprimierenden Zellen auf mRNA- und Proteinebene untersucht: MACC1 führt zu einer starken Induktion der Met-Expression. Die Genspezifität dieses Effektes konnte mittels MACC1- und Met-spezifischer siRNA validiert werden. SiRNA-Analysen zeigten weiterhin, dass auch in dem endogen MACC1 exprimierenden Zelllinien-Modell die Met-Expression durch MACC1 reguliert wird. Um die Bedeutung von Met für die MACC1-induzierten Effekte auf Migration, Invasion und Proliferation zu untersuchen, wurde mittels Met-spezifischer siRNAs die Rolle der Met-Expression in den biologischen Assays analysiert. Die gezeigte Revertierung der MACC1-abhängigen Motilität und Proliferation durch Met siRNA, weist darauf hin, dass die nachgewiesenen biologischen Effekte auf der MACC1-induzierten transkriptionellen Aktivierung des HGF-Rezeptors Met basieren (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Vorgeschlagener Mechanismus zur MACC1-vermittelten Aktivierung des HGF/Met-Signalweges in Tumorzellen.**

Die Bindung des Liganden HGF führt zur Autophosphorylierung der RTK Met. MACC1 interagiert mittels seiner Domänen mit dem aktivierten HGF/Met-Signalweg und transloziert in den Zellkern. Es konnte gezeigt werden, dass die MACC1-induzierten Signale über MAPK-Signale vermittelt werden. Die entsprechenden Interaktionspartner wurden jedoch noch nicht identifiziert. Auch Interaktionen mit weiteren Molekülen des rekrutierten Signalkomplexes oder weiteren durch HGF/Met induzierten Signalkaskaden sind denkbar.

Im Zellkern agiert MACC1 als Transkriptionsfaktor und induziert die Met-Expression durch Bindung an den -223 → -68 bp Abschnitt des Promoters. Da MACC1 selbst über keine DNA-Bindedomäne verfügt ist anzunehmen, dass es die Transkription über Komplexbildung mit weiteren Faktoren reguliert. Die in dem betroffenen Promotorabschnitt liegenden Bindestellen für AP2 und Sp1 machen eine Interaktion von MACC1 mit diesen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich.

MACC1-überexprimierende Zellen zeigen eine starke Induktion der Met-Expression. Die verstärkte Verfügbarkeit des Rezeptors führt zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem Liganden, der wiederum die Translokation von MACC1 in den Kern initiiert. MACC1 induziert somit in den Zellen einen positiven Rückkopplungseffekt und verursacht dadurch eine anhaltende Aktivierung des HGF/Met-Signalweges. Die MACC1-vermittelte Aktivierung der HGF/Met-Signale reguliert die migratorischen, invasiven und proliferativen Eigenschaften von Tumorzellen und induziert Tumorstadium und Metastasierung.

Der Rezeptor Met wird nach HGF-Bindung in Folge der Phosphorylierung am Tyrosin 1003 ubiquitiniert, internalisiert und im Proteasom degradiert. Somit wird die Attenuierung des Signals gewährleistet. Die Deletion des

regulatorischen Tyrosins im onkogenen Tpr-Met führt zu einer Stabilisierung des Rezeptors und anhaltender Aktivierung des Signalweges.

MACC1 führt durch einen anderen Mechanismus zur dauerhaften Aktivierung der HGF/Met-Signale: Es induziert nach HGF-Ligandenbindung die Neusynthese des Rezeptors und kreiert somit eine positive Feedback-Schleife. Die erhöhte Met-Expression sensitiviert die Zellen gegenüber HGF-Signalen und verstärkt somit die zelluläre Antwort hinsichtlich Motilität, Invasivität und Proliferation (Abb. 4.1).

Eine Met-Überexpression wurde bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen, so auch im Kolonkarzinom.<sup>98,105</sup> Sie korreliert mit der Tumorprogression und der Metastasierung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MACC1 als neu identifizierter transkriptioneller Regulator des HGF-Rezeptors in diesem Prozess eine zentrale Stellung einnimmt.

#### **4.4 MACC1 als neues Zielgen für die Prävention der Metastasierung**

In der Tumorthherapie finden immer häufiger molekulare, genspezifische Strategien Anwendung. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl Antikörper und Small-Molecule-Inhibitoren entwickelt, die gezielt Proteine mit Funktion in der Tumorentwicklung und der Metastasierung blockieren. Viele der Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien geprüft, einige wurden bereits für die klinische Anwendung zugelassen.<sup>230</sup> Ein Großteil der bisher etablierten Inhibitoren interagiert mit Tyrosinkinasen.<sup>231</sup> Hierzu gehört z.B. der Small-Molecule-Inhibitor Gleevec (Imatinib). Gleevec inhibiert das onkogene Fusionsprotein Bcr-Abl, eine der molekularen Ursachen der CML (Chronic myeloid leukemia). Der Antikörper Herceptin (Trastuzumab) inhibiert die Rezeptor-Tyrosinkinase Her2/*neu* und wird für die Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms angewandt. Für die Therapie des Kolonkarzinoms werden in der Klinik zurzeit Erbitux (Cetuximab), ein EGFR-Inhibitor, sowie Avastin (Bevacizumab), ein VEGF-Inhibitor, eingesetzt. Zusätzlich werden RNA-basierte Technologien entwickelt, die mit der Expression der onkogenen Proteine interferieren. Hierzu gehören Antisense-Oligonukleotide, siRNA-basierte Technologien und Ribozyme.<sup>232</sup>

Die Schlüsselrolle von MACC1 als Induktor der HGF/Met-vermittelten Tumorprogression und Metastasierung macht es zu einem idealen Zielgen für Interventionsstrategien. Es wurde hier bereits gezeigt, dass die Applikation MACC1-spezifischer siRNA effektiv den metastatischen Phänotyp hinsichtlich Motilität, Invasivität und Proliferation inhibieren kann.

In weiterführenden Arbeiten der AG Stein/Walther (I. Kelch) wurden bereits MACC1 siRNA-basierte shRNA-Konstrukte etabliert, die eine Langzeitexpression der interferierenden Oligonukleotide ermöglichen. Erste Analysen im Tiermodell zeigten nach MACC1-shRNA Applikation eine deutliche Reduktion der Metastasierung. Für die zukünftige Entwicklung MACC1-gerichteter Interventionsstrategien wäre auch ein Screening entsprechender Substanz-Bibliotheken nach Small-Molecule-Inhibitoren oder die Generierung monoklonaler Antikörper denkbar. Basis hierfür muss jedoch auch eine tiefergehende Analyse der zellulären MACC1-Funktion sein.

Das hier identifizierte transkriptionelle Zielgen von MACC1, der HGF-Rezeptor Met, ist als Schlüsselmolekül des Metastasierungsprozesses schon seit längerem im Fokus der Tumorthherapie. Bis heute wurde eine Vielzahl verschiedener Ansätze für HGF/Met-gerichtete Interventionsstrategien entwickelt und auch bereits erfolgreich *in vivo* getestet.

So wurde gezeigt, dass die Expression von dominant-negativem Met mit Mutationen in ATP-Bindestellen, Tyrosin-Phosphorylierungsstellen oder der Kinasedomäne die Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors verhindert.<sup>233,234</sup> Mehrere Arbeiten wiesen im *in vivo* Modell eine deutliche Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung durch Applikation dominant-negativen Mets nach.<sup>199,233</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden mit rekombinantem Met, bestehend aus Komponenten der extrazellulären Domänen (Decoy-Met) erzielt.<sup>235,236</sup> Andere therapeutische Strategien zielen auf die Blockierung des Rezeptors durch den Einsatz Met-spezifischer Antikörper.<sup>233,236</sup> Auch RNA-basierte Technologien wie siRNA, shRNA oder Ribozyme wurden bereits erfolgreich getestet.<sup>237-240</sup> Daneben wurde eine Reihe von Small-Molecule-Inhibitoren identifiziert, die die Aktivität der Rezeptor-Tyrosinkinase effektiv blockieren. Die prominentesten, K252a, SU11274 und PHA665752 inhibieren auch im Tiermodell die Tumorigenität transplantierter Zellen.<sup>125,241-243</sup>

Neben dem Rezeptor Met ist auch der Ligand HGF Ansatzpunkt von Interventionsstrategien. Es wurde bereits gezeigt, dass HGF-spezifische Antikörper in der Lage sind, das *in vivo* Tumorwachstum zu inhibieren.<sup>244,245</sup>

Als eine der vielversprechendsten Interventionsstrategien erscheint der therapeutische Einsatz des HGF-Antagonisten NK4. NK4 besteht aus der N-terminalen Domäne und den 4 Kringle-Domänen des Liganden HGF. Es ist somit in der Lage an den Met-Rezeptor zu binden, vermittelt jedoch nicht dessen Aktivierung und Phosphorylierung.<sup>246</sup> Der therapeutische Effekt von NK4 wurde bereits in einer Vielzahl verschiedener Tiermodelle nachgewiesen. NK4-Gentransfer oder die Applikation rekombinanten NK4s inhibiert die Angiogenese, das Tumorwachstum und die Metastasierung.<sup>246</sup> Diese Ergebnisse wurden auch in Kolonkarzinom-Modellen bestätigt.<sup>247-249</sup>

Nicht nur HGF und sein Rezeptor Met sind Ziel der molekularen Intervention, sondern auch die nachgeschalteten Signalmoleküle, die die HGF/Met-Signale vermitteln. So wurden unter anderem Inhibitoren für Gab1, Grb2, Ras, und Raf, PI3K, MAPK, Stat3 und Src auf ihren therapeutischen Effekt hin analysiert.<sup>116,125,234,250</sup>

Die bisher vorliegenden Daten belegen, dass die therapeutische Inhibition des HGF/Met-Signalweges eine signifikante Reduktion der Tumorprogression und Metastasierung ermöglicht. Mit MACC1 als neu identifiziertem Regulator des Met-Rezeptors steht für diesen Signalweg ein weiteres, sehr attraktives Interventionsziel zur Verfügung. Die hier gezeigten *in vitro* Analysen zeigen eine deutliche Reduktion der Met-Expression durch MACC1 siRNA mit drastischen Effekten auf die metastatischen Eigenschaften der Tumorzellen. Ausgehend von diesen Daten müssen nun weitere effektive molekulare Strategien entwickelt werden für eine therapeutische Intervention der MACC1-induzierten HGF/Met-vermittelten Tumorprogression und Metastasierung.

## 4.5 MACC1 und die Metastasierungsprognose bei Kolonkarzinom-Patienten

### 4.5.1 MACC1 ist ein prognostischer Marker für die Metastasierung

Die Fernmetastasierung ist für 90% der durch das Kolonkarzinom bedingten Todesfälle verantwortlich. Betroffene Patienten haben eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 8%.<sup>4,68</sup> Die Prognose für den Patienten und die entsprechende Therapieplanung wird heute vorrangig anhand histopathologischer Parameter wie Tumorinfiltration, Nodalstatus und Fernmetastasierung vorgenommen (TNM-Klassifikation). Klinische Studien der letzten Jahre zeigten jedoch, dass die Klassifikation für Patienten mit intermediärer Tumorprogression (UICC-Stadien II und III) nicht zufriedenstellend ist.<sup>70</sup> Patienten mit positivem Nodalstatus (UICC III) erhalten derzeit entsprechend der Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft eine adjuvante Chemotherapie.<sup>68</sup> Für Patienten ohne Befall der regionalen Lymphknoten (Stadium I und II) ist dagegen keine einheitliche Therapie indiziert, da der Nutzen der Chemotherapie für diese Patienten sehr umstritten ist. 30-40% der Patienten in diesen frühen Tumorprogressionsstadien zeigen jedoch ein Wiederauftreten des Tumors oder Metastasierung.<sup>73,76</sup> Die Identifizierung von Patienten mit hoher Metastasierungswahrscheinlichkeit bereits im frühen Stadium der Tumorprogression würde ermöglichen, diese Patienten selektiv zu therapieren. Niedrigrisiko-Patienten könnte außerdem die Nebenwirkungs-reiche Chemotherapie erspart werden.

In den vergangenen Jahren hat die Forschung viel zur Klärung der molekularen Ursachen von Tumorprogression und Metastasierung beigetragen. Für einige der genetischen und epigenetischen Alterationen, z.B. in Onkogenen und Tumor-Suppressoren der Adenom-Karzinom-Sequenz, wurde bereits ein Einfluss auf die Überlebensprognose des Patienten und das Ansprechen auf die Therapie nachgewiesen.<sup>5,69,70</sup> Bisher sind die Daten zur prognostischen Qualität jedoch kontrovers, so dass zum heutigen Zeitpunkt für keinen der molekularen Marker eine Empfehlung für die klinische Anwendung durch die „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO) oder die „European Group on Tumour Markers“ (EGTM) vorliegt.<sup>88,89</sup>

MACC1 wurde in einer Genom-weiten Suche nach in Normalgeweben, Primärtumoren und Fernmetastasen differentiell exprimierten Genen identifiziert.<sup>134</sup> In dieser Arbeit wurde MACC1 in einer retrospektiven Analyse auf seinen prognostischen Wert für die Metastasierung des Kolonkarzinoms geprüft. Hierzu wurde mittels qRT-PCR die MACC1-Expression in rezidierten, zum Zeitpunkt der Operation nicht-metastasierten Primärtumoren (UICC I-III) determiniert und mit der metachronen Metastasierung dieser Patienten korreliert. Die Patientenanalysen ergaben eine direkte Korrelation der MACC1-Expression im Primärtumor mit der metachronen Metastasierung: Metastasierende Primärtumoren wiesen eine signifikant erhöhte mediane MACC1-Expression von 392,78 auf, verglichen mit nur 115,31 in nicht-metastatischen Tumoren. Diese Differenzierung zeigte sich auch in der Einzeluntersuchung der frühen und fortgeschrittenen UICC Stadien I+II und III. Demnach ist MACC1 schon zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorprogression in

metastasierenden Patienten als überexprimiertes Gen nachweisbar. Dies macht MACC1 zu einem sehr interessanten Kandidaten für die frühe Metastasierungsprognose.

Zur Evaluierung des prognostischen Potentials wurde in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse die MACC1-Expression mit dem metastasenfreien Überleben der Patienten korreliert. In der Gesamtanalyse der UICC-Stadien I-III zeigten MACC1 hoch-exprimierende Patienten ein signifikant schlechteres metastasenfreies 5-Jahres-Überleben (15%) als niedrig-exprimierende Patienten (80%). Auch in der Einzelanalyse der frühen (UICC I+II) und fortgeschrittenen (UICC III) Stadien konnte diese Korrelation bestätigt werden. MACC1 erwies sich somit als signifikant prognostischer Marker für das metastasenfreie Überleben der Kolonkarzinom-Patienten. Logistische- und Cox-Regression bestätigten die Unabhängigkeit der MACC1-Prognose von Alter und Geschlecht des Patienten, sowie von den etablierten Markern des TNM-Systems Tumorinfiltration, Nodalstatus und Fernmetastasierung.

Nur molekulare Marker, die bereits in einem frühen Stadium der Tumorprogression determiniert werden, können für eine sinnvolle prognostische Aussage herangezogen werden. Die Expressionsanalysen in Mucosa, Adenomen und Karzinomen belegen, dass MACC1 bereits in Tumoren des UICC-Stadiums I signifikant überexprimiert wird. Mit fortschreitender Tumorprogression findet nur noch eine sehr geringfügige Erhöhung des MACC1-Expressionsniveaus statt. Die Deregulierung der MACC1-Expression tritt demnach bereits in einem frühen Stadium der Tumorprogression ein. Die gezeigte Korrelation von MACC1 mit der Metastasierung und dem metastasenfreien 5-Jahres-Überleben auch in den frühen UICC-Stadien I+II unterstreicht diese Aussage.

Mit Hilfe von MACC1 als prognostischem Marker gelang es auch in den frühen UICC-Stadien I+II, Subklassen von Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko zu identifizieren. Demnach ermöglicht MACC1 die Detektion von Hochrisiko-Patienten bereits zu einem Zeitpunkt der Tumorprogression, in dem die Prognose durch den Nodalstatus noch nicht greift.

Die Qualität eines prognostischen Markers wird anhand der Parameter Sensitivität und Spezifität determiniert.<sup>88,251</sup> Die Sensitivität sagt aus, welcher Prozentsatz der metachron-metastasierenden Patienten mit Hilfe des Markers korrekt identifiziert wurde. Die Spezifität kennzeichnet dagegen, zu welchem Prozentsatz metastasenfreie Patienten korrekt unterschieden wurden.

Zwischen Sensitivität und Spezifität besteht ein Gleichgewicht. Eine sehr hohe Sensitivität des Markers kann dessen Spezifität reduzieren und führt somit zu falsch-positiven Ergebnissen. Patienten mit niedrigem Metastasierungsrisiko würden fälschlicherweise als gefährdet eingestuft werden und unnötig eine Zusatz-Therapie erhalten. Umgekehrt geht eine hohe Spezifität zu Lasten der Sensitivität und kann falsch-negative Ergebnisse verursachen. Hochrisiko-Patienten würden also zu einem geringeren Anteil identifiziert werden. Sensitivität und Spezifität der prognostischen Marker müssen deshalb in klinischen Studien eingehend evaluiert und optimiert werden.<sup>252,253</sup>

Derzeit konnte für keines der molekularen prognostischen Kandidatengene wie z.B. Ras, p53 oder DCC in klinischen Studien eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für die klinische Routine-Anwendung nachgewiesen werden.<sup>90</sup> Ein Problem hierbei ist die genetische Heterogenität des Kolonkarzinoms. So zeigte eine Meta-Analyse klinischer Studien, dass von 12 bekannten Mutationen im Ras-Onkogen nur eine prognostischen Wert besaß; diese war jedoch nur in 8,6% aller Patienten nachweisbar.<sup>90,254</sup>

MACC1 zeigte eine Spezifität von 86,5% und eine Sensitivität von 60,9%. Somit wurde mit Hilfe der MACC1-Prognose ein hoher Prozentsatz der Patienten mit niedrigem Risiko korrekt identifiziert. Die relativ niedrige Sensitivität weist allerdings darauf hin, dass ein Teil der metastasierenden Patienten falsch-negativ eingestuft wurde. Dementsprechend liegt der negative prädiktive Wert, also die Wahrscheinlichkeit bei niedrigem MACC1-Wert metastasenfrei zu bleiben, bei 78,1%. Der positive prädiktive Wert, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass es bei einem hohen MACC1-Wert tatsächlich zur metachronen Metastasierung kommt, liegt bei 73,7%. (Die Kreuztabellen zur Berechnung der Daten finden sich im Anhang.)

Die MACC1-Analyse ermöglicht eine recht solide Einschätzung des Metastasierungsrisikos des Patienten. Diese Angaben zeigen aber auch, dass sich nach diesen ersten, viel versprechenden Ergebnissen größere, prospektive klinische Studien anschließen müssen, um den Wert von MACC1 als molekularen, prognostischen Metastasierungsmarker zu validieren. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der prognostischen Qualität liegt z.B. in der Kombination von MACC1 mit weiteren molekularen Markern.

#### 4.5.2 Die Prognose durch MACC1 und Met

Der HGF-Rezeptor Met wird in vielen Tumorentitäten überexprimiert. Die Met-Überexpression korreliert häufig mit einer schlechten Prognose für den Patienten.<sup>105</sup> Auch für die Entität des Kolonkarzinoms wurde Met als molekularer Marker für die Metastasierungsprognose geprüft. Mehrere Studien zeigten eine signifikante Korrelation der Met-Überexpression mit Fernmetastasierung und einem verringerten Gesamtüberleben des Patienten<sup>99,100</sup>. Die bisher vorliegenden Analysen klinischer Proben lieferten jedoch keine einheitliche Aussage zur prognostischen Qualität von Met, so dass eine weitere Evaluierung des Markers notwendig ist.<sup>105,255,256</sup>

Expressionsanalysen in Tumorproben der verschiedenen UICC-Stadien wiesen nach, dass die Alteration der Met-Expression ein frühes Ereignis in der Tumorprogression ist.<sup>98-100,257,258</sup> Für MACC1, den hier identifizierten transkriptionellen Regulator von Met, wurde ebenfalls eine Überexpression im frühen Stadium der Tumorigenese nachgewiesen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die *in vitro* gezeigte Co-Regulation der beiden Gene auch im humanen Kolonkarzinom vorliegt. Mittels Immunhistochemie konnte außerdem eine Co-Lokalisation von MACC1 und Met in Tumorproben nachgewiesen werden.<sup>134</sup> Die frühe Expression dieser beiden Metastasierungs-assoziierten Gene stützt zusätzlich die These der frühen Determinierung des metastatischen Potentials einer Tumorzelle in der Tumorprogression.<sup>11,52</sup>

Anhand des für die MACC1-Analyse genutzten Patientenkollektivs wurde der prognostische Wert des MACC1-Zielgenes Met analysiert. Metachron metastasierende Patienten der UICC-Stadien I-III zeigten eine erhöhte Met-Expression. In der Überlebenszeitanalyse errechnete sich für Met-hoch-exprimierende Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 52 %, verglichen mit 72 % in der niedrig exprimierenden Gruppe. Weder die Prognose der Metastasierung noch des metastasenfreien-Überlebens erreichten jedoch Signifikanz. Dies spiegelt sich auch in den Werten für Sensitivität (60,9 %) und Spezifität (56,8 %) des Markers. Entsprechend liegt bei einer hohen Met-Expression die Wahrscheinlichkeit, dass es tatsächlich auch zur Fernmetastasierung kommt bei nur 46,7 %. Die Met-Prognose allein ermöglicht also für die hier untersuchten Tumorproben keine zuverlässige Aussage über das Metastasierungsrisiko des Patienten. Eine Assoziation zwischen Met-Überexpression und Metastasierung ist jedoch klar nachweisbar. Dieses Ergebnis spiegelt auch die derzeitige Diskussion von Met als prognostischem Marker in der Literatur wieder.<sup>99,100,255,256</sup>

Einige Studien streben eine Verbesserung der Prognose-Qualität durch Kombination mehrerer molekularer und epigenetischer Marker an.<sup>81,83,84</sup>

Auch MACC1 und Met wurden in einer kombinierten Überlebensanalyse auf eine verbesserte Metastasierungsprognose im Vergleich zu den Einzelgen-Analysen hin untersucht. 39 der 60 Patienten zeigten eine Co-Expression der beiden prognostischen Marker MACC1 und Met: In 25 Tumoren wurden beide Marker niedrig exprimiert, in 14 dagegen hoch. Die verbleibenden 21 Patienten wiesen dagegen eine ambivalente Expression von MACC1 und Met auf. Die recht große ambivalente Patientengruppe bedingt eine geringe Spezifität (54,1%) und Sensitivität (43,5 %) der kombinierten MACC1/Met-Prognose. Patienten die beide Marker niedrig exprimieren, bleiben jedoch mit 80%iger Wahrscheinlichkeit metastasenfrei. Dies bedeutet eine leichte Verbesserung des negativ prädiktiven Wertes gegenüber der MACC1-Einzelgen-Prognose.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MACC1 in der hier untersuchten Patientengruppe einen höheren prognostischen Wert hat als der bekannte Metastasierungsmarker Met. Auch die Berücksichtigung beider Marker konnte die Prognose der MACC1-Einzelanalyse nicht weiter verbessern. Diese ersten Patientenanalysen zeigen, dass MACC1 ein viel versprechendes Kandidatengen als molekularer Marker für die Metastasierungsprognose des Kolonkarzinoms ist.

#### 4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das neu identifizierte Gen MACC1 Motilität, Invasivität und Proliferation von Tumorzellen induziert. MACC1 ist somit ein zentraler Regulator in der Tumprogression und Metastasierung. MACC1 steuert diese Metastasierungs-assoziierten Parameter über Interaktion mit dem HGF/Met-Signalweg und transkriptionelle Aktivierung des HGF-Rezeptors Met. Das MACC1-Expressionsniveau im Primärtumor ist prognostisch für das Risiko einer metachronen Metastasierung und das metastasenfreie-Überleben von Kolonkarzinom-Patienten.



Im Folgenden muss nun die zelluläre Funktion von MACC1, seine Interaktion mit dem HGF/Met-Signalweg und seine Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung genauer untersucht werden.

MACC1-transgene-, und knock-out-Tiermodelle werden entscheidende Einblicke in die zelluläre Funktion dieses neu identifizierten Proteins ermöglichen. In einem weiteren Projekt wird die Analyse des MACC1-Promotors erfolgen, um z.B. der Fragestellung nach der Induktion der MACC1-Expression in malignen Geweben nachzugehen.

Der Einsatz von Inhibitoren mit Spezifität für Moleküle des HGF/Met-MAPK-Signalweges könnte zur genaueren Aufklärung der hier gezeigten MACC1-Interaktion mit diesen Signalen beitragen. Außerdem wird eine mögliche Kooperation von MACC1 mit weiteren Metastasierungs-assoziierten Signaltransduktionskaskaden untersucht werden.

Um die Rolle von MACC1 als Aktivator der Met-Expression zu untersuchen, wurden bereits erste Reporter-gen-Experimente durchgeführt, die Hinweise auf eine Interaktion von MACC1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren lieferten. Diese Ergebnisse sind zu validieren. Außerdem bleibt zu evaluieren, inwieweit MACC1 als transkriptioneller Regulator weiterer Gene, neben Met, fungiert. Bereits geplante Microarray-Analysen werden hierzu erste Daten liefern.

In einer größeren klinischen Studie wird die Qualität von MACC1 als molekularer prognostischer Marker eingehend geprüft und bestätigt werden. Die prospektive Validierung der Daten wird bereits in Zusammenarbeit mit der Robert-Rössle-Klinik durchgeführt. Eine Kombination von MACC1 mit weiteren molekularen Markern oder gar die Etablierung einer prognostischen Gensignatur sind ebenfalls denkbar.

Ein zentrales Forschungsziel ist die Entwicklung MACC1-gerichteter Interventionsstrategien. Hierzu gehört z.B. die Suche nach MACC1-spezifischen Inhibitoren oder die Prüfung einer therapeutischen Anwendung MACC1-spezifischer Antikörper. Erste therapeutische Ansätze mit siRNA-basierten Strategien zeigten positive Ergebnisse. Dies könnte die Grundlage für eine effektive, MACC1-gerichtete, molekulare Intervention gegen Tumorprogression und Metastasierung des Kolonkarzinoms bilden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) Berlin. (2008).
- 2 Etzioni, R. et al., The case for early detection. *Nat Rev Cancer* **3** (4), 243 (2003).
- 3 Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Howlader N, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/), based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site. (2007).
- 4 O'Connell, J. B., Maggard, M. A., and Ko, C. Y., Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* **96** (19), 1420 (2004).
- 5 Stein, U. and Schlag, P. M., Clinical, biological, and molecular aspects of metastasis in colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res* **176**, 61 (2007).
- 6 Christofori, G., New signals from the invasive front. *Nature* **441** (7092), 444 (2006).
- 7 de la Chapelle, A., Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **4** (10), 769 (2004).
- 8 Rustgi, A. K., The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* **21** (20), 2525 (2007).
- 9 Lynch, H. T. and de la Chapelle, A., Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348** (10), 919 (2003).
- 10 Kinzler, K. W. and Vogelstein, B., Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87** (2), 159 (1996).
- 11 Weinberg, R. A., *The Biology of Cancer*. (Garland Science, 2007).
- 12 Potten, C. S. and Loeffler, M., Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110** (4), 1001 (1990).
- 13 Bjerknes, M. and Cheng, H., Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **116** (1), 7 (1999).
- 14 Radtke, F. and Clevers, H., Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307** (5717), 1904 (2005).
- 15 Radtke, F., Clevers, H., and Riccio, O., From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med* **6** (3), 275 (2006).
- 16 van den Brink, G. R. and Offerhaus, G. J., The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell* **11** (2), 109 (2007).
- 17 Shih, I. M. et al., Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (5), 2640 (2001).
- 18 Preston, S. L. et al., Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* **63** (13), 3819 (2003).

- 19 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414** (6859), 105 (2001).
- 20 Jordan, C. T., Guzman, M. L., and Noble, M., Cancer stem cells. *N Engl J Med* **355** (12), 1253 (2006).
- 21 Polyak, K. and Hahn, W. C., Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* **12** (3), 296 (2006).
- 22 Pinto, D. and Clevers, H., Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* **97** (3), 185 (2005).
- 23 Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., and Berman, D. M., Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432** (7015), 324 (2004).
- 24 Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H., Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 695 (2004).
- 25 Fearon, E. R. and Vogelstein, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61** (5), 759 (1990).
- 26 Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9** (4), 138 (1993).
- 27 Boland, C. R. and Goel, A., Somatic evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol* **15** (6), 436 (2005).
- 28 Arends, J. W., Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* **190** (4), 412 (2000).
- 29 Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H., APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **1** (1), 55 (2001).
- 30 Kerr, D., Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3** (8), 615 (2003).
- 31 Knudson, A. G., Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1** (2), 157 (2001).
- 32 Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396** (6712), 643 (1998).
- 33 Fodde, R. et al., Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3** (4), 433 (2001).
- 34 Hanahan, D. and Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **100** (1), 57 (2000).
- 35 Hahn, W. C. and Weinberg, R. A., Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347** (20), 1593 (2002).
- 36 Futreal, P. A. et al., A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4** (3), 177 (2004).
- 37 Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10** (8), 789 (2004).
- 38 Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P., and Bodmer, W. F., Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* **35** (14), 1986 (1999).
- 39 Cardoso, J., Boer, J., Morreau, H., and Fodde, R., Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* **1775** (1), 103 (2007).
- 40 Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301** (5895), 89 (1983).
- 41 Esteller, M., Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8** (4), 286 (2007).

- 42 Welch, D. R., Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis* **26**, 3 (2006).
- 43 Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C., Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2** (8), 563 (2002).
- 44 Pantel, K. and Brakenhoff, R. H., Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **4** (6), 448 (2004).
- 45 Maurer, C. A. et al., [The role of lymph nodes in colon carcinoma]. *Zentralbl Chir* **125** (10), 863 (2000).
- 46 Pantel, K., Brakenhoff, R. H., and Brandt, B., Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* **8** (5), 329 (2008).
- 47 Kallinowski, F. and Schmidt, J., Das Kolonkarzinom. Empfehlungen für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Available at <http://www.dkfz-heidelberg.de>, (1999).
- 48 Paget, S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8** (2), 98 (1989).
- 49 Fidler, I. J., The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3** (6), 453 (2003).
- 50 Ewing, J., in *Neoplastic Diseases. A Treatise on Tumors* (W.B. Saunders Co., Philadelphia & London, 1928), pp. 77.
- 51 Steeg, P. S., Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12** (8), 895 (2006).
- 52 Bernards, R. and Weinberg, R. A., A progression puzzle. *Nature* **418** (6900), 823 (2002).
- 53 Van't Veer, L. J. and Weigelt, B., Road map to metastasis. *Nat Med* **9** (8), 999 (2003).
- 54 van 't Veer, L. J. et al., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415** (6871), 530 (2002).
- 55 Weigelt, B. et al., Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (26), 15901 (2003).
- 56 Sugarbaker, P. H., Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol Suppl* **3**, 158 (1993).
- 57 Weiss, L., Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* **54**, 159 (1990).
- 58 Heppner, G. H., Tumor heterogeneity. *Cancer Res* **44** (6), 2259 (1984).
- 59 Talmadge, J. E., Wolman, S. R., and Fidler, I. J., Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases. *Science* **217** (4557), 361 (1982).
- 60 Nguyen, D. X. and Massague, J., Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8** (5), 341 (2007).
- 61 Eccles, S. A. and Welch, D. R., Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* **369** (9574), 1742 (2007).
- 62 Mareel, M. and Leroy, A., Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **83** (2), 337 (2003).
- 63 Bogenrieder, T. and Herlyn, M., Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22** (42), 6524 (2003).
- 64 Liotta, L. A. and Kohn, E. C., The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411** (6835), 375 (2001).

- 65 Mueller, M. M. and Fusenig, N. E., Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4** (11), 839 (2004).
- 66 Langley, R. R. and Fidler, I. J., Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* **28** (3), 297 (2007).
- 67 Kopfstein, L. and Christofori, G., Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* **63** (4), 449 (2006).
- 68 Graeven, U. and Schmiegel, W., [Colon carcinoma. Consensus of therapeutic strategies]. *Internist (Berl)* **41** (9), 876 (2000).
- 69 Bendardaf, R., Lamlum, H., and Pyrhonen, S., Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **24** (4), 2519 (2004).
- 70 McLeod, H. L. and Murray, G. I., Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* **79** (2), 191 (1999).
- 71 Wittekind, C., Meyer, H.-J., and Bootz, F., *TNM. Klassifikation maligner Tumoren*, 6 ed. (Springer, 2007).
- 72 *AJCC Cancer Staging Manual*, 6 ed. (Springer, 2002).
- 73 Graziano, F. and Cascinu, S., Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol* **14** (7), 1026 (2003).
- 74 Moertel, C. G. et al., Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* **122** (5), 321 (1995).
- 75 Smith, R. E. et al., Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* **96** (15), 1128 (2004).
- 76 Macdonald, J. S., Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin* **49** (4), 202 (1999).
- 77 O'Connell, M. J. et al., Current status of adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. Can molecular markers play a role in predicting prognosis? *Cancer* **70** (6 Suppl), 1732 (1992).
- 78 Watanabe, T. et al., Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* **344** (16), 1196 (2001).
- 79 Ribic, C. M. et al., Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* **349** (3), 247 (2003).
- 80 Diep, C. B. et al., Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **21** (5), 820 (2003).
- 81 Bird, N. C., Mangnall, D., and Majeed, A. W., Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* **94** (1), 68 (2006).
- 82 Ludwig, J. A. and Weinstein, J. N., Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* **5** (11), 845 (2005).
- 83 Garrity, M. M. et al., Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* **22** (9), 1572 (2004).

- 84 Rosati, G. et al., Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol* **25** (5-6), 258 (2004).
- 85 Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R. S., Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* **23** (3), 609 (2005).
- 86 Soreide, K. et al., Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* **93** (4), 395 (2006).
- 87 Zhou, W. et al., Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet* **359** (9302), 219 (2002).
- 88 Duffy, M. J. et al., Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* **43** (9), 1348 (2007).
- 89 Locker, G. Y. et al., ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* **24** (33), 5313 (2006).
- 90 Duffy, M. J. et al., Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* **39** (6), 718 (2003).
- 91 Sidransky, D., Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* **2** (3), 210 (2002).
- 92 Shih, W., Chetty, R., and Tsao, M. S., Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* **13** (3), 517 (2005).
- 93 Eschrich, S. et al., Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **23** (15), 3526 (2005).
- 94 Bitarte, N. et al., Moving forward in colorectal cancer research, what proteomics has to tell. *World J Gastroenterol* **13** (44), 5813 (2007).
- 95 Thomas, R. K. et al., High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* **39** (3), 347 (2007).
- 96 Ransohoff, D. F., Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. *Nat Rev Cancer* **4** (4), 309 (2004).
- 97 Ransohoff, D. F., Evaluating discovery-based research: when biologic reasoning cannot work. *Gastroenterology* **127** (4), 1028 (2004).
- 98 Di Renzo, M. F. et al., Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **1** (2), 147 (1995).
- 99 Takeuchi, H. et al., c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* **9** (4), 1480 (2003).
- 100 Kammula, U. S. et al., Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome. *Cancer Lett* **248** (2), 219 (2007).
- 101 Nakamura, T. et al., Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342** (6248), 440 (1989).
- 102 Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J., Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327** (6119), 239 (1987).

- 103 Weidner, K. M. et al., Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (16), 7001 (1991).
- 104 Gherardi, E. and Stoker, M., Hepatocytes and scatter factor. *Nature* **346** (6281), 228 (1990).
- 105 Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F., Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (12), 915 (2003).
- 106 Lokker, N. A. et al., Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* **11** (7), 2503 (1992).
- 107 Hartmann, G. et al., A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (23), 11574 (1992).
- 108 Cooper, C. S. et al., Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311** (5981), 29 (1984).
- 109 Bottaro, D. P. et al., Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251** (4995), 802 (1991).
- 110 Gherardi, E. et al., Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (21), 12039 (2003).
- 111 Ponzetto, C. et al., A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77** (2), 261 (1994).
- 112 Birchmeier, C. and Gherardi, E., Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* **8** (10), 404 (1998).
- 113 Rosario, M. and Birchmeier, W., How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* **13** (6), 328 (2003).
- 114 Zhang, Y. W. and Vande Woude, G. F., HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* **88** (2), 408 (2003).
- 115 Chmielowiec, J. et al., c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* **177** (1), 151 (2007).
- 116 Maulik, G. et al., Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* **13** (1), 41 (2002).
- 117 Weidner, K. M. et al., Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* **384** (6605), 173 (1996).
- 118 Schaeper, U. et al., Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* **149** (7), 1419 (2000).
- 119 Boon, E. M. et al., Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res* **62** (18), 5126 (2002).
- 120 Stella, M. C., Trusolino, L., Pennacchietti, S., and Comoglio, P. M., Negative feedback regulation of Met-dependent invasive growth by Notch. *Mol Cell Biol* **25** (10), 3982 (2005).

- 121 Rosario, M. and Birchmeier, W., Making tubes: step by step. *Dev Cell* **7** (1), 3 (2004).
- 122 Boccaccio, C. and Comoglio, P. M., Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* **6** (8), 637 (2006).
- 123 Gentile, A., Trusolino, L., and Comoglio, P. M., The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27** (1), 85 (2008).
- 124 Peschard, P. and Park, M., From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* **26** (9), 1276 (2007).
- 125 Benvenuti, S. and Comoglio, P. M., The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* **213** (2), 316 (2007).
- 126 Kang, Y. and Massague, J., Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118** (3), 277 (2004).
- 127 Thiery, J. P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2** (6), 442 (2002).
- 128 Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., and Salgia, R., c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev* **22** (4), 309 (2003).
- 129 Trusolino, L. and Comoglio, P. M., Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* **2** (4), 289 (2002).
- 130 Cortner, J., Vande Woude, G. F., and Rong, S., The Met-HGF/SF autocrine signaling mechanism is involved in sarcomagenesis. *EXS* **74**, 89 (1995).
- 131 Gao, C. F. and Vande Woude, G. F., HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res* **15** (1), 49 (2005).
- 132 Liu, C., Park, M., and Tsao, M. S., Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas. *Oncogene* **7** (1), 181 (1992).
- 133 Otte, J. M. et al., Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer. *Digestion* **61** (4), 237 (2000).
- 134 Stein, U. et al., MACC1, a newly identified key regulator of HGF/Met signaling is a powerful predictor of colon cancer metastasis. *in Revision bei Nature Medicine* (2008).
- 135 Scherer, S. W. et al., Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* **300** (5620), 767 (2003).
- 136 Dunlevy, J. R. et al., Cloning, chromosomal localization, and characterization of cDNA from a novel gene, SH3BP4, expressed by human corneal fibroblasts. *Genomics* **62** (3), 519 (1999).
- 137 Tosoni, D. et al., TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor. *Cell* **123** (5), 875 (2005).
- 138 Martin, G. S., The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2** (6), 467 (2001).
- 139 Yeatman, T. J., A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* **4** (6), 470 (2004).
- 140 Manning, G. et al., The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298** (5600), 1912 (2002).



- 141 Pawson, T. and Nash, P., Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300** (5618), 445 (2003).
- 142 Li, S. S., Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390** (Pt 3), 641 (2005).
- 143 Blume-Jensen, P. and Hunter, T., Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411** (6835), 355 (2001).
- 144 Ostman, A., Hellberg, C., and Bohmer, F. D., Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* **6** (4), 307 (2006).
- 145 Liu, Y., The human hepatocyte growth factor receptor gene: complete structural organization and promoter characterization. *Gene* **215** (1), 159 (1998).
- 146 Ausubel, F. M., *Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
- 147 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. (1989).
- 148 Consortium, International Human Genome Sequencing, Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431** (7011), 931 (2004).
- 149 Toledo, F. et al., Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol Cell Biol* **27** (4), 1425 (2007).
- 150 Leibovitz, A. et al., Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **36** (12), 4562 (1976).
- 151 Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1), 156 (1987).
- 152 Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248 (1976).
- 153 Boyden, S., The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* **115**, 453 (1962).
- 154 Entschladen, F. et al., Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* **307** (2), 418 (2005).
- 155 Albini, A. et al., A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* **47** (12), 3239 (1987).
- 156 Crnic, I. and Christofori, G., Novel technologies and recent advances in metastasis research. *Int J Dev Biol* **48** (5-6), 573 (2004).
- 157 Wang, G. K. and Zhang, W., The signaling network of tumor invasion. *Histol Histopathol* **20** (2), 593 (2005).
- 158 Rodriguez, L. G., Wu, X., and Guan, J. L., Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* **294**, 23 (2005).
- 159 Liang, C. C., Park, A. Y., and Guan, J. L., In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2** (2), 329 (2007).
- 160 Spencer, V. A., Sun, J. M., Li, L., and Davie, J. R., Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* **31** (1), 67 (2003).

- 161 Becker, M. et al., Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer* **87** (11), 1328 (2002).
- 162 Schafer, H., Constructing a cut-off point for a quantitative diagnostic test. *Stat Med* **8** (11), 1381 (1989).
- 163 Meister, G. and Tuschl, T., Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431** (7006), 343 (2004).
- 164 Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T., RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15** (2), 188 (2001).
- 165 Valster, A. et al., Cell migration and invasion assays. *Methods* **37** (2), 208 (2005).
- 166 Shaw, L. M., Tumor cell invasion assays. *Methods Mol Biol* **294**, 97 (2005).
- 167 Wang, L. H., Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* **71** (6), 361 (2004).
- 168 Radisky, D. C., Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* **118** (Pt 19), 4325 (2005).
- 169 Kubens, B. S. and Zanker, K. S., Differences in the migration capacity of primary human colon carcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Cancer Lett* **131** (1), 55 (1998).
- 170 Ziegler, A., Lange, S., and Bender, R., [Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method]. *Dtsch Med Wochenschr* **132** Suppl 1, e36 (2007).
- 171 Lewitzky, M. et al., The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* **20** (9), 1052 (2001).
- 172 Vidal, M., Gigoux, V., and Garbay, C., SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents. *Crit Rev Oncol Hematol* **40** (2), 175 (2001).
- 173 Giavazzi, R. et al., Experimental nude mouse model of human colorectal cancer liver metastases. *J Natl Cancer Inst* **77** (6), 1303 (1986).
- 174 Tibbetts, L. M., Doremus, C. M., Tzanakakis, G. N., and Vezeridis, M. P., Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production. *Cancer* **71** (2), 315 (1993).
- 175 Shah, V., Kumar, S., and Zirvi, K. A., Metastasis of human colon tumor cells in vivo: correlation with the overexpression of plasminogen activators and 72 kDa gelatinase. *In Vivo* **8** (3), 321 (1994).
- 176 Reddig, P. J. and Juliano, R. L., Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* **24** (3), 425 (2005).
- 177 Bellusci, S. et al., Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene* **9** (4), 1091 (1994).
- 178 Rong, S. et al., Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (11), 4731 (1994).
- 179 Jeffers, M., Rong, S., and Woude, G. F., Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* **74** (9), 505 (1996).

- 180 Francone, T. D. et al., Novel xenograft model expressing human  
hepatocyte growth factor shows ligand-dependent growth of c-Met-  
expressing tumors. *Mol Cancer Ther* **6** (4), 1460 (2007).
- 181 Patane, S. et al., MET overexpression turns human primary osteoblasts  
into osteosarcomas. *Cancer Res* **66** (9), 4750 (2006).
- 182 Sakata, H. et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression  
induces growth, abnormal development, and tumor formation in  
transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ* **7** (11), 1513 (1996).
- 183 Wang, R. et al., Activation of the Met receptor by cell attachment induces  
and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol*  
**153** (5), 1023 (2001).
- 184 Horiguchi, N. et al., Hepatocyte growth factor promotes  
hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced  
angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine.  
*Oncogene* **21** (12), 1791 (2002).
- 185 Yu, Y. and Merlino, G., Constitutive c-Met signaling through a  
nonautocrine mechanism promotes metastasis in a transgenic  
transplantation model. *Cancer Res* **62** (10), 2951 (2002).
- 186 Zhang, Y. W. et al., Enhanced growth of human met-expressing  
xenografts in a new strain of immunocompromised mice transgenic for  
human hepatocyte growth factor/scatter factor. *Oncogene* **24** (1), 101  
(2005).
- 187 Stabile, L. P. et al., Transgenic mice overexpressing hepatocyte growth  
factor in the airways show increased susceptibility to lung cancer.  
*Carcinogenesis* **27** (8), 1547 (2006).
- 188 Graveel, C. R., London, C. A., and Vande Woude, G. F., A mouse model  
of activating Met mutations. *Cell Cycle* **4** (4), 518 (2005).
- 189 Gavert, N. and Ben-Ze'ev, A., Epithelial-mesenchymal transition and the  
invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* (2008).
- 190 Chen, H. C., Cell-scatter assay. *Methods Mol Biol* **294**, 69 (2005).
- 191 Furge, K. A., Zhang, Y. W., and Vande Woude, G. F., Met receptor  
tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*  
**19** (49), 5582 (2000).
- 192 Potempa, S. and Ridley, A. J., Activation of both MAP kinase and  
phosphatidylinositol 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth  
factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell*  
**9** (8), 2185 (1998).
- 193 Xiao, G. H. et al., Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth  
factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-  
activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (1), 247  
(2001).
- 194 Favata, M. F. et al., Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated  
protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273** (29), 18623 (1998).
- 195 Powis, G. et al., Wortmannin, a potent and selective inhibitor of  
phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54** (9), 2419 (1994).
- 196 Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., and Birchmeier, W., The  
motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through  
the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J  
Biol Chem* **269** (35), 21936 (1994).

- 197 Seiden-Long, I. et al., Gab1 but not Grb2 mediates tumor progression in Met overexpressing colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **29** (3), 647 (2008).
- 198 Long, I. S. et al., Met receptor overexpression and oncogenic Ki-ras mutation cooperate to enhance tumorigenicity of colon cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* **1** (5), 393 (2003).
- 199 Furge, K. A. et al., Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (19), 10722 (2001).
- 200 Webb, C. P. et al., Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* **17** (16), 2019 (1998).
- 201 Paumelle, R. et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* **21** (15), 2309 (2002).
- 202 Oikawa, T. and Yamada, T., Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **303**, 11 (2003).
- 203 Boon, E. M., Kovarikova, M., Derksen, P. W., and van der Neut, R., MET signalling in primary colon epithelial cells leads to increased transformation irrespective of aberrant Wnt signalling. *Br J Cancer* **92** (6), 1078 (2005).
- 204 Liang, C. C. and Chen, H. C., Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to integrin alpha 2 expression that is involved in cell scattering. *J Biol Chem* **276** (24), 21146 (2001).
- 205 Seiden-Long, I. M. et al., Transcriptional targets of hepatocyte growth factor signaling and Ki-ras oncogene activation in colorectal cancer. *Oncogene* **25** (1), 91 (2006).
- 206 Orian-Rousseau, V. et al., CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* **16** (23), 3074 (2002).
- 207 Bertotti, A., Comoglio, P. M., and Trusolino, L., Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res* **65** (23), 10674 (2005).
- 208 Boccaccio, C. et al., Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391** (6664), 285 (1998).
- 209 Zhang, Y. W., Wang, L. M., Jove, R., and Vande Woude, G. F., Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* **21** (2), 217 (2002).
- 210 Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K., and Vuori, K., Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene* **18** (54), 7775 (1999).
- 211 Muller, M., Morotti, A., and Ponzetto, C., Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol Cell Biol* **22** (4), 1060 (2002).
- 212 Monga, S. P. et al., Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* **62** (7), 2064 (2002).
- 213 Herynk, M. H., Tsan, R., Radinsky, R., and Gallick, G. E., Activation of c-Met in colorectal carcinoma cells leads to constitutive association of

- tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *Clin Exp Metastasis* **20** (4), 291 (2003).
- 214 Rasola, A. et al., A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene* **26** (7), 1078 (2007).
- 215 Gambarotta, G. et al., Structure and inducible regulation of the human MET promoter. *J Biol Chem* **269** (17), 12852 (1994).
- 216 Pellikainen, J. M. and Kosma, V. M., Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer* **120** (10), 2061 (2007).
- 217 Li, Q. and Dashwood, R. H., Activator protein 2alpha associates with adenomatous polyposis coli/beta-catenin and Inhibits beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **279** (44), 45669 (2004).
- 218 Safe, S. and Abdelrahim, M., Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* **41** (16), 2438 (2005).
- 219 Safe, S. and Kim, K., Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**, 1 (2004).
- 220 Zhang, X. et al., Sp1 and Sp3 transcription factors synergistically regulate HGF receptor gene expression in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **284** (1), F82 (2003).
- 221 Zhang, X., Yang, J., Li, Y., and Liu, Y., Both Sp1 and Smad participate in mediating TGF-beta1-induced HGF receptor expression in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **288** (1), F16 (2005).
- 222 Zhang, X. and Liu, Y., Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. *Am J Physiol Renal Physiol* **284** (6), F1216 (2003).
- 223 Moghul, A. et al., Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* **9** (7), 2045 (1994).
- 224 Zarnegar, R., Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS* **74**, 33 (1995).
- 225 Salazar-Montes, A. et al., Increased DNA binding activity of NF-kappaB, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J Gastroenterol* **12** (37), 5995 (2006).
- 226 Pennacchietti, S. et al., Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3** (4), 347 (2003).
- 227 Chen, Q., Seol, D. W., Carr, B., and Zarnegar, R., Co-expression and regulation of Met and Ron proto-oncogenes in human hepatocellular carcinoma tissues and cell lines. *Hepatology* **26** (1), 59 (1997).
- 228 Seol, D. W., Chen, Q., and Zarnegar, R., Transcriptional activation of the hepatocyte growth factor receptor (c-met) gene by its ligand (hepatocyte growth factor) is mediated through AP-1. *Oncogene* **19** (9), 1132 (2000).
- 229 Ivan, M. et al., Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* **14** (20), 2417 (1997).
- 230 Adams, G. P. and Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23** (9), 1147 (2005).

- 231 Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A., The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4** (5), 361 (2004).
- 232 Kalota, A., Dondeti, V. R., and Gewirtz, A. M., Progress in the development of nucleic acid therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* (173), 173 (2006).
- 233 Corso, S., Comoglio, P. M., and Giordano, S., Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med* **11** (6), 284 (2005).
- 234 Peruzzi, B. and Bottaro, D. P., Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **12** (12), 3657 (2006).
- 235 Michieli, P. et al., Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* **6** (1), 61 (2004).
- 236 Kong-Beltran, M., Stamos, J., and Wickramasinghe, D., The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* **6** (1), 75 (2004).
- 237 Herynk, M. H. et al., Down-regulation of c-Met inhibits growth in the liver of human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* **63** (11), 2990 (2003).
- 238 Ma, P. C. et al., Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **65** (4), 1479 (2005).
- 239 Jiang, W. G. et al., Reduction of stromal fibroblast-induced mammary tumor growth, by retroviral ribozyme transgenes to hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, c-MET. *Clin Cancer Res* **9** (11), 4274 (2003).
- 240 Corso, S. et al., Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* **27** (5), 684 (2008).
- 241 Koon, E. C. et al., Effect of a c-Met-specific, ATP-competitive small-molecule inhibitor SU11274 on human ovarian carcinoma cell growth, motility, and invasion. *Int J Gynecol Cancer* (2007).
- 242 Christensen, J. G. et al., A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res* **63** (21), 7345 (2003).
- 243 Puri, N. et al., A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts. *Cancer Res* **67** (8), 3529 (2007).
- 244 Cao, B. et al., Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (13), 7443 (2001).
- 245 Burgess, T. et al., Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors. *Cancer Res* **66** (3), 1721 (2006).
- 246 Matsumoto, K. and Nakamura, T., NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. *Front Biosci* **13**, 1943 (2008).
- 247 Parr, C. et al., Nk4, a new HGF/SF variant, is an antagonist to the influence of HGF/SF on the motility and invasion of colon cancer cells. *Int J Cancer* **85** (4), 563 (2000).
- 248 Wen, J. et al., Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor, suppresses liver metastasis and

- invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Ther* **11** (6), 419 (2004).
- 249 Wen, J. et al., Inhibition of colon cancer growth and metastasis by NK4 gene repetitive delivery in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **358** (1), 117 (2007).
- 250 Zhang, Y. W., Graveel, C., Shinomiya, N., and Vande Woude, G. F., Met decoys: will cancer take the bait? *Cancer Cell* **6** (1), 5 (2004).
- 251 Loong, T. W., Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain. *BMJ* **327** (7417), 716 (2003).
- 252 Pepe, M. S. et al., Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* **93** (14), 1054 (2001).
- 253 Benowitz, S., Biomarker boom slowed by validation concerns. *J Natl Cancer Inst* **96** (18), 1356 (2004).
- 254 Andreyev, H. J. et al., Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* **85** (5), 692 (2001).
- 255 Umeki, K., Shiota, G., and Kawasaki, H., Clinical significance of c-met oncogene alterations in human colorectal cancer. *Oncology* **56** (4), 314 (1999).
- 256 Resnick, M. B. et al., Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* **10** (9), 3069 (2004).
- 257 Fujita, S. and Sugano, K., Expression of c-met proto-oncogene in primary colorectal cancer and liver metastases. *Jpn J Clin Oncol* **27** (6), 378 (1997).
- 258 Fazekas, K. et al., Experimental and clinicopathologic studies on the function of the HGF receptor in human colon cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* **18** (8), 639 (2000).

## ANHANG

**LIG ClatBox 1**

1 atgctaactcactgaagaaacatttcggtcaggaagaattgcacaaagtatgtctgaagcaaatgtgacatggaagctggaacactctcaaaagtgcacatattacagaatgc  
M L I T E R K H F R S G R I A Q S M S E A N L I D M E A G K L S K S C N I T E C

**NPF** **NPF**

121 caggacccagactgtctcacaattggccgatgtctccacctctgtggaataatgctccaaagtgcaaatccattctggaatcaactgtctcttaacccattttggatgac  
Q D P D L L H N W P D A F T L R G N N A S K V A N P F W N Q L S A S N P F L D D

**LIG RB**

241 ataactcaactaagaataacaggaagagaataatttccattctaaaggaagatcctttcttctgtagagaataagaaatgaaattctttgactcctcggtgatgaact  
I T Q L R N N R K R N N I S I L K E D P F L F C R E I E N G N S F D S S G D E L

361 gatgtcatcagttacttaggcagacttctcagaagaattcgaagatctaaagtggttcagaactctggacattttagacgacacagcacatgccatcagagtatacataactct  
D V H Q L L R Q T S S R N S G R S K S V S E L L D I L D D T A H A H Q S I H N S

481 gaccagatcctactacagacttagagtggtctaaagtgcggaggctataaaatggttggttaagtaacgacagctggccgctcctgcttgattgaataaattagtcag  
D Q I L L H D L E W L K N D R E A Y K M A W L S Q R Q L A R S C L D L N T I S Q

**LIG SH3 3** **LIG SH3 3**

601 agccctggatgggcccagacacaaactgcggaggtcaccatagctgcaagtaaacacacaggaaggtcagtaatactcgaatcagacatcactgtccatgcccgaagtc  
S P G W A Q T Q L A E V T I A C K V N H Q G G S V Q L P E S D I T V H V P Q G H

721 gtggctgtgggaagaattccaaggtgtctcgaaggcttctgtatccgacacatgcttaacatgactctgtgactgtgagccgtgttggaatcatgttaggcaactc  
V A V G E F Q E V S L R A F L D P P H M L N H D L S C T V S P L L E I M L G N L

841 aatacaatggaagccctttgtcggatgaaatgggctgaagtaagaaggatccttcagccaagtcatgacagaatgggtgtttacacagctgggtaagaagcccttt  
N T M E A L L L E M K I G A E V R K D P F S Q V M T E M V C L H S L G K E G P F

961 aaagtgttaagcaactgtcatattataaagacacatccaagtaagctacgtgagtcaggtatgtatctagtggtgtgctgacagaactaaagctcctcgctcaccagctgcc  
K V L S N C Y I Y K D T I Q V K L I D L S Q V M Y L V V A A Q A K A L P S P A A

**LIG SH2 PTP2**

1081 accatttgggtatattacacaaacacactcaattggaattatggaccaaataatccatccagttttactgtgttttaacagtttgggacacaattatgcccaggacagctt  
T I W D Y I H K T T S I G I Y G P K Y I H P S F T V V L T V C G H N Y M P G Q L

1201 acaattctgatattaagaagggtggaaaaaacatatctccagttgtttcagctctgggggaagcagtcatttttactgacaagccacaagatttaagattatttttctgt  
T I S D I K K G G K N I S P V V F Q L W G K Q S F L L D K P Q D L S I S I F S C

1321 gatcctgatttgaagtaagacagaaggaggaaggaagaataaacaagaacagtggaagcaggtgaagtagtcatcaacaatttttttcttagtgacacagagagatg  
D P D F E V K T E G R K E I K Q K Q L E A G E V V H Q Q F L F S L V E H R E M

**LIG SH3 3**

1441 cactgtgttattttgttcaagtggaagcctcccaatgggtgaaccagtgacagttctctactactcctgatccaaccccaacctaataaagactcgaatctgccaggctat  
H L F D F C V Q V E P P N G E P V A Q F S I T T P D P T P N L K R L S N L P G Y

**PXXP** **LIG SH3 3**

1561 ttgcagaagaaggaggaatcaagtcgtctcttatacacaataatctgttaataatcctacatttcaagataaacattgaacttttagcaactatgggtaacccctgaaggcagtg  
L Q K K E E I K S A P L S P K I L V K Y P T F Q D K T L N F S N Y G V T L K A V

**SH3 Domäne**

1681 ctaagacaagaagattgattactcctgaatatccaaggggacacaatagctctcctcggggaaggttaaggttaagctattggtcagtcacaagtgaagaatggtatgtagga  
L R Q S K I D Y F L E Y F K G D T I A L L G E G K V K A I G Q S K V K E W Y V G

1801 gtcctcagaggtgaagattggactgtacactgcacaaatgcaagggttcaaaaggagcaagtaagtgttatgtagatgtctttacaaccagaatcttctgaacagattgc  
V L R G K I G L V H C K N V K V I S K E Q V M F M S D S V F T T R N L L E Q I V

**LIG SH2 SRC** **Y 673**

1921 ctgaccttaaaaaattgacttatatctactcagttgtatcaactgtgtgcagaaaagtgttatggaagtttagctgtatgctcgtgggttactcacatctgcctggaagat  
L P L K K L T Y I Y S V V L T L V S E K V Y D W K V L A D V L G Y S H L S L E D

**Y 695**

2041 ttgatcaaatcaagcagacaagaatcctatgttataagaagttaaaggaagattgccacacagagagaatacaaggaagttctgtatgaactattgtggct  
F D Q I Q A D K E S E K V S Y V I K K L K E D C H T E R N T R K F L Y E L I V A

**LIG ClatBox 1**

2161 ctctgaaaatggatgccaagagttatgcacgtctcatccaagaagctgtgtctgactcagctgcaagcttggaagagctggagggaactagctgaaagttagtacgactc  
L L K M D C Q E L V A R L I Q E A A V L T S A V K L G K G W R E L A E K L V R L

**LIG SH2 SRC** **Y 793** **LIG**

2281 acaaagcaacaatggaggcatatgaattcctcatcgaggaaacactggagatgttgctgttgatgatgtggaacctgctatgatttctgtatacctggagtgctcactatgga  
T K Q Q M E A Y E I P H R G N T G D V A V E M M W K P A Y D F L Y T W S A H Y G

**SH2 SRC**

2401 aataactacagagatgtttacaagccttcagtcagcttggacagaatgaaaaacccctgactaaacactggagagaattaactggagtttaatactagtaaatcttggaggt  
N N Y R D V L Q D L Q S A L D R M K N P V T K H W R E L T G V L I L V N S L E V

**LIG TRAF2 1**

2521 ttgagagtaactgattcctcacttctgaggaagatag  
L R V T A F S T S E E V Stop

## Anhang 1: Sequenz und putative Domänenstruktur des neu identifizierten Genes MACC1.

Die SH3-Domäne sowie das PXXP-Motiv und die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen konnten bereits als funktionelle Strukturen validiert werden.<sup>134</sup>



Geschlecht	Alter bei OP	T	N	M	UICC	Metachrone Metastasierung	Normale Mucosa	Adenom	Primäres Kolonkarzinom
w	32						x		
m	17						x		
m	84						x		
m	67						x		
m	65						x	x	
w	72						x	x	
m	57						x	x	
w	59						x	x	
w	20						x	x	
m	55						x	x	
m	78						x	x	
w	36						x	x	
m	75						x	x	
m	76						x	x	
w	79						x	x	
m	70							x	
m	65							x	
m	55	2	0	0	I				x
w	78	2	0	0	I				x
m	71	2	0	0	I				x
m	69	2	0	0	I				x
m	38	2	0	0	I				x
m	61	2	0	0	I				x
m	57	1	0	0	I				x
w	58	1	0	0	I				x
m	58	2	0	0	I				x
w	51	1	0	0	I				x
m	60	2	0	0	I				x
m	62	1	0	0	I				x
m	67	2	0	0	I				x
m	77	2	0	0	I				x
w	62	1	0	0	I				x
m	79	2	0	0	I	x			x
m	64	2	0	0	I	x			x

### Anhang 2/I: Übersicht der für die MACC1-Analyse verwendeten klinischen Proben.

Es wurden 15 Proben normaler Mucosa, 13 Adenome, 17 Kolonkarzinome des UICC-Stadiums I, 23 Kolonkarzinome des UICC-Stadiums II, und 20 Kolonkarzinome des UICC-Stadiums III analysiert.

Medianes Alter der Patienten: Normale Mucosa: 65; Adenome: 65; UICC I: 62; UICC II: 63; UICC III: 65; UICC I-III: 63,5.

23 der 60 Kolonkarzinom-Patienten zeigten im Verlauf der Nachbeobachtungszeit metachrone Metastasierung, 37 blieben metastasenfrei.

Geschlecht	Alter bei OP	T	N	M	UICC	Metachrone Metastasierung	Normale Mucosa	Adenom	Primäres Kolonkarzinom
m	66	3	0	0	II				x
m	61	3	0	0	II				x
m	62	3	0	0	II				x
w	58	3	0	0	II				x
w	70	3	0	0	II				x
w	53	3	0	0	II				x
w	71	3	0	0	II				x
w	44	4	0	0	II				x
m	64	4	0	0	II				x
w	71	3	0	0	II				x
m	64	3	0	0	II				x
m	73	3	0	0	II				x
m	59	3	0	0	II	x			x
w	48	4	0	0	II	x			x
w	60	4	0	0	II	x			x
m	63	4	0	0	II	x			x
w	69	3	0	0	II	x			x
m	77	3	0	0	II	x			x
m	71	4	0	0	II	x			x
m	77	4	0	0	II	x			x
w	53	3	0	0	II	x			x
m	63	3	0	0	II	x			x
m	45	3	0	0	II	x			x
w	58	3	1	0	III				x
m	59	3	1	0	III				x
m	57	4	3	0	III				x
w	88	3	3	0	III				x
m	71	2	3	0	III				x
w	60	3	1	0	III				x
w	65	3	1	0	III				x
m	74	3	1	0	III				x
m	64	4	1	0	III				x
m	81	3	1	0	III				x
m	74	2	1	0	III	x			x
m	59	2	1	0	III	x			x
w	69	3	1	0	III	x			x
w	45	3	3	0	III	x			x
w	53	3	1	0	III	x			x
m	65	3	1	0	III	x			x
m	80	2	1	0	III	x			x
w	60	3	2	0	III	x			x
w	67	4	1	0	III	x			x
m	65	3	x	0	III	x			x

**Anhang 2/II: Übersicht der für die MACC1-Analyse verwendeten klinischen Proben. (Fortsetzung)**

**A**

	metachrone Metastasierung		
	nein	ja	
<b>MACC1 niedrig</b>	32	9	<b>Negativ prädiktiver Wert</b> RN/(RN+FN) 78,1%
	RN	FN	
<b>MACC1 hoch</b>	5	14	<b>Positiv prädiktiver Wert</b> RP/(RP+FP) 73,7%
	FP	RP	
	RN+FP=37	FN+RP=23	
	<b>Spezifität</b> RN/(RN+FP) 86,5%	<b>Sensitivität</b> RP/(RP+FN) 60,9%	

**B**

	metachrone Metastasierung		
	nein	ja	
<b>Met niedrig</b>	21	9	<b>Negativ prädiktiver Wert</b> RN/(RN+FN) 70%
	RN	FN	
<b>Met hoch</b>	16	14	<b>Positiv prädiktiver Wert</b> RP/(RP+FP) 46,7%
	FP	RP	
	RN+FP=37	FN+RP=23	
	<b>Spezifität</b> RN/(RN+FP) 56,8%	<b>Sensitivität</b> RP/(RP+FN) 60,9%	

**C**

	metachrone Metastasierung		
	nein	ja	
<b>MACC1/Met niedrig</b>	20	5	<b>Negativ prädiktiver Wert</b> RN/(RN+FN) 80%
	RN	FN	
<b>MACC1/Met hoch</b>	4	10	<b>Positiv prädiktiver Wert</b> RP/(RP+FP) 71,7%
	FP	RP	
<b>MACC1/Met ambivalent</b>	13	8	
	AN	AP	
	RN+FP+AN=37	FN+RP+AP=23	
	<b>Spezifität</b> RN/(RN+FP+AN) 54,1%	<b>Sensitivität</b> RP/(RP+FN+AP) 43,5%	

**Anhang 3: Kreuztabellen zur Berechnung der Spezifität, der Sensitivität und der negativen/ positiven prädiktiven Werte für (A) MACC1, (B) Met und (C) die MACC1/Met-Kombinationsanalyse.<sup>251</sup>**

Abkürzungen: FP: falsch positiv, FN: falsch negativ, RP: richtig positiv, RN: richtig negativ, AP: ambivalent (positiv), AN: ambivalent (negativ)

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung habe ich zur Kenntnis genommen. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 26. 5. 2008

Franziska Arlt

## PUBLIKATIONEN UND TEILNAHME AN KONGRESSEN

### Publikationen

**F. Arlt**, H. Schmidt, J. Smith, P. Herrmann, F. G. Rathjen, P. M. Schlag, and U. Stein. Gipc-1 is an interaction partner of MACC1 with implications in colon cancer. *Manuskript in Vorbereitung*.

U. Stein, W. Walther, **F. Arlt**, H. Schwabe, J. Smith, I. Fichtner, W. Birchmeier, and P. M. Schlag. MACC1, a newly identified key regulator of HGF/Met signaling is a powerful predictor of colon cancer metastasis. *in Revision bei Nature Medicine*.

W. Walther, **F. Arlt**, I. Fichtner, J. Aumann, U. Stein, and P. M. Schlag. Heat-inducible in vivo gene therapy of colon carcinoma by human mdrl promoter-regulated tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Mol Cancer Ther* 6, 236-243 (2007)

U. Stein, **F. Arlt**, W. Walther, J. Smith, T. Waldman, E. D. Harris, S. D. Mertins, C. W. Heizmann, D. Allard, W. Birchmeier, P. M. Schlag, and R. H. Shoemaker. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131, 1486-1500 (2006)

W. Walther, U. Stein, I. Fichtner, D. Kobelt, J. Aumann, **F. Arlt**, and P. M. Schlag. Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. *Mol Ther* 12, 1176-1184 (2005)

### Teilnahme an Kongressen

**F. Arlt**, J. Smith, C. Fleuter, W. Walther, W. Birchmeier, P. M. Schlag, U. Stein. OMCC, a newly identified regulator of the Met signaling pathway, is prognostic for colon cancer metastasis. *Poster-Vortrag auf dem Deutschen Krebskongress 2008, Berlin*

**F. Arlt**, J. Smith, C. Fleuter, W. Walther, W. Birchmeier, P. M. Schlag, U. Stein. The newly identified metastasis associated gene OMCC is a master regulator of the Met signaling pathway in human colon cancer. *Vortrag auf der "18<sup>th</sup> European Students' Conference" 2007, Berlin*  
*Session Winner*

**F. Arlt**, J. Smith, C. Fleuter, W. Walther, W. Birchmeier, P. M. Schlag, U. Stein. OMCC, a newly identified gene, is a regulator of the Met signalling pathway. *Vortrag auf dem MDC/ FMP PhD Symposium "Walking Molecular Pathways" 2006, Motzen*

Teilnahme an der Summer School Signalling in cancer (HGF research program „Cell and Tumour Biology“), 2005, Weil der Stadt.

**F. Arlt**, W. Walther, U. Stein, I. Fichtner, P. M. Schlag. *In vitro* and *in vivo* characterization of a hyperthermia-inducible vector system for tumor gene therapy. *Poster Präsentation auf dem Deutschen Krebsskongress 2004, Berlin*

Erläuterung:

MACC1, als neu identifiziertes Gen, wurde in der AG Stein/Walther zunächst unter der Bezeichnung OMCC (Overexpressed in Metastatic Colon Cancer) oder auch Prognostin bearbeitet. Aufgrund dessen wurden Teile dieser Arbeit unter diesen Gennamen vorgestellt.

Da diese Bezeichnungen jedoch den Kriterien des internationalen „HUGO Gene Nomenclature Committee“ nicht standhielten, trägt das Gen nun die endgültige Bezeichnung MACC1 (Metastasis-associated in colon cancer 1).

Dieser, auch in dieser Arbeit verwendete Name, wurde durch das „HUGO Gene Nomenclature Committee“ bereits bestätigt ([www.genenames.org](http://www.genenames.org)).

Berlin, den 26. 5. 2008

Franziska Arlt

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem PD Dr. Ulrike Stein und Prof. Dr. Peter M. Schlag. Sie haben mir die Möglichkeit gegeben, an diesem sehr interessanten Projekt zu arbeiten und in ihrer Forschungsgruppe meine Promotion anzufertigen. Die Gelegenheit, an der „Entdeckung“ eines völlig neu identifizierten Gens mitzuarbeiten, wird sicherlich immer seltener. Es war immer mein Ziel, mit meiner Arbeit einen klinisch relevanten Beitrag zur Forschung zu leisten. Diese Arbeit ist hoffentlich ein erster Schritt in diese Richtung.

Ich möchte mich insbesondere bei PD Dr. Ulrike Stein bedanken. Mit ihrer Unterstützung, den zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und auch ihren Ermutigungen hat sie meiner Arbeit immer neue, entscheidende Impulse gegeben.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Achim Leutz für seine Bereitschaft, als Betreuer dieser Arbeit an der Humboldt-Universität zu fungieren.

Ein herzliches Dankeschön geht an Janice Smith. Ihre exzellente technische Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Gemeinsam haben wir die letzten vier Jahre MACC1-Forschung mit all seinen Höhen und Tiefen bewältigt.

Ich möchte mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern der AG Stein/Walther, insbesondere bei PD Dr. Wolfgang Walther und Dennis Kobelt bedanken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme und haben mich mit zahlreichen Vorschlägen und Hinweisen unterstützt.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Robert-Rössle-Klinik, Markus Niederstrasser und Ina Wendler. Ohne ihre Kooperation bei der Analyse der Tumorkranken und der statistischen Auswertung der Patienten-Daten wäre die Evaluierung von MACC1 als klinisch-relevant, molekularer Marker nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre rückhaltlose Unterstützung und Motivation wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.